

MTA Doktori Értekezés

Kullancsok, óvontagok és általuk hordozott kórokozók rendszerani, öko-járványtani és földrajzi vizsgálata



Dr. Hornok Sándor

Állatorvostudományi Egyetem
Parazitológiai és Állattani Tanszék

Budapest, 2018

Tartalomjegyzék

Előszó és célkitűzések.....	4
1. Fontosabb rövidítések	5
2. Bevezetés és szerkesztési, szóhasználati szempontok.....	6
3. Anyag és módszer.....	7
3.1. Mintagyűjtési módszerek.....	7
3.2. Morfológiai fajhatározás.....	7
3.3. DNS kivonás.....	7
3.4. PCR módszerek.....	7
3.5. Filogenetikai vizsgálatok.....	7
3.6. Leggyakrabban alkalmazott statisztikai módszerek.....	7
4. Eredmények és megbeszélésük	
<u>4.1. Tudományra új kullancsfajok</u>	
4.1.1. Az <i>Ixodes ariadnae</i> Hornok, 2014 jellemzése.....	10
4.1.2. Az <i>Ixodes collaris</i> Hornok, 2016 jellemzése.....	18
<u>4.2. Kullancsok és egy óvontag közvetítette kórokozó új rendszertani viszonyai</u>	
4.2.1. Madarak kullancsainak (<i>Ixodes</i> , <i>Hyalomma</i> és <i>Haemaphysalis</i> spp.) filogenetikai vizsgálata.....	24
4.2.2. Ragadozók és denevérek kullancsainak (<i>Ixodes</i> spp.) filogenetikai vizsgálata.....	31
4.2.3. A <i>Haemaphysalis erinacei</i> filogenetikai vizsgálata	36
4.2.4. A <i>Babesia vesperuginis</i> filogenetikai vizsgálata.....	40
<u>4.3. Kullancsfajok tér- és időbeli előfordulása</u>	
4.3.1. Természetes élőhelyek hatása a kullancsfajok előfordulására, szezonálisára hazánkban.....	43
4.3.2. A hazánkban előforduló fontosabb kullancsfajok szezonálisára.....	48
4.3.3. Városi élőhelyek hatása a kullancsfajok előfordulására, szezonálisára.....	51
4.3.4. Az autópálya mint mesterséges barrier hatása a kullancsok előfordulására.....	55
4.3.5. A természetes barrierékkal elválasztott (barlangi) denevérek kullancs populációk genetikai heterogenitása.....	56
<u>4.4. Kullancs közvetítette kórokozók tér- és időbeli előfordulása</u>	
4.4.1. Kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulása épületen belül.....	59
4.4.2. Kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulása a városközpontban, télen.....	61
4.4.3. Városi élőhelyek hatása kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulására.....	64
4.4.4. A <i>Babesia canis</i> szezonálisára <i>Dermacentor reticulatus</i> kullancsfajban városi élőhelyen.....	65
4.4.5. Az autópálya mint mesterséges barrier hatása kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulására.....	69

<u>4.5. Molekuláris bizonyíték kullancs közvetítette kórokozók jelenlétére új gazdafajokban vagy kullancsaikban</u>	
4.5.1. Madarak mint a <i>Rickettsia helvetica</i> rezervoárjai	73
4.5.2. Denevérek mint humán- és állategészségügyi szempontból jelentős piroplasmák feltételezett rezervoárjai: kullancsvizsgálat.....	77
4.5.3. Denevérek mint humán- és állategészségügyi szempontból jelentős piroplasmák feltételezett rezervoárjai: ürülékvizsgálat.....	84
4.5.4. Borz eredetű <i>Babesia</i> -faj DNS-e kutyákban.....	87
4.5.5. Vadon élő ragadozók és a szarvasmarha Anaplasmataceae családba tartozó baktériumainak DNS-e kutyákban.....	90
<u>4.6. Kullancsfajok első azonosítása hazánkban és más európai országokban.....</u>	<u>96</u>
<u>4.7. Kullancs közvetítette kórokozók első molekuláris azonosítása hazánk illetve Európa vonatkozásában.....</u>	<u>99</u>
<u>4.8. Kullancs- és óvontagfajok, valamint általuk közvetített kórokozók összehasonlítása tágabb földrajzi értelemben</u>	
4.8.1. Denevérkullancs-fajok genetikai heterogenitása Euráziában.....	105
4.8.2. A denevéróvontag (<i>Argas vespertilionis</i>) genetikai heterogenitása az Óvilágban.....	111
4.8.3. A denevéróvontag (<i>Argas vespertilionis</i>) és a <i>Babesia vesperuginis</i> genetikai hasonlósága Közép-Európa és Közép-Ázsia között.....	117
4.8.4. Madárkullancsokban azonosított babesiák genetikai hasonlósága Közép-Európa és a Távols-Kelet között.....	121
4.8.5. A <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. filogenetikai megosztottsága a Kelet- és a Nyugat-Mediterráneum között.....	124
5. Új tudományos eredmények	134
6. A doktori mű alapjául szolgáló saját közlemények	135
7. Irodalomjegyzék	138
8. Köszönetnyilvánítás	153

Előszó és célkitűzések

A kullancsok és óvontagok (Acari: Ixodida) kiemelkedő humán- és állategészségügyi jelentőségű, vérszívó ektoparaziták, amelyek nemcsak vérszívásukkal és az általuk kibocsátott bioaktív anyagokkal károsíthatják gazdaszervezeteiket, hanem *vector-borne* kórokozókat is terjeszthetnek. A kullancsok és óvontagok modern, molekuláris módszerekkel végzett parazitológiai kutatása többretű lehet. Ezek közé tartozik szekvencia alapú összehasonlításuk és filogenetikai vizsgálatuk, amely kiegészítő ismereteket nyújthat hagyományos, morfológiai azonosításukhoz és rendszertani besorolásukhoz. A nagy érzékenységgű molekuláris módszerek ugyanakkor megkönnyíthetik a bennük lévő kórokozók kimutatását is. Óvatosan kell azonban értékelni az így kapott információ újdonságerejét. Egyrészt a kórokozók DNS-ének azonosítása kullancsokban vagy óvontagokban nem feltétlenül jelenti ezek átvivő képességét (vektorkompetenciáját). Másrészt célszerű mérlegelni, hogy a manapság növekvő fontosságúnak ("*emerging*") tartott fajok új előfordulási adatai valóban terjedést tükröznek-e és nem abból adódtak, hogy a kimutatásukra használt módszerek sokkal érzékenyebbek a korábbiaknál.

Világviszonylatban mintegy 900 kullancs- és óvontagfaj ismert, amelyek közül közel 70 fordul elő Európában, és legalább 24 (azaz 21 kullancsfaj és 3 óvontagfaj) Magyarországon. Ezek száma azonban bővülni látszik, nemcsak egyes fajok növekvő elterjedési területének, de az újonnan felfedezett fajoknak köszönhetően is.

Egyes kullancsfajok, kullancs közvetítette kórokozók (illetve általuk okozott kórképek) előfordulása évtizedek óta ismert hazánkban, de újabbak felbukkanására is számíthatunk. Ennek valószínűségét növeli a melegedőben lévő éghajlat, amely már Magyarországon is érzékelhető; továbbá hazánk kivételes földrajzi fekvése, minthogy olyan közép-európai ország, ahol nem akadályozzák hegyvonulatok (Alpok, Kárpátok) a vektorok és kórokozók mediterrán térségből észak felé való terjedését. A folyamatot felgyorsíthatja, hogy a kórokozókat hordozó kullancsok gazdáik – főleg a repülni képes madarak, denevérek – révén akár egyszerre nagyobb távolságot is megtehetnek. Ráadásul, számos közép- vagy hosszú távon vonuló madár- és denevérfaj synanthrop életmódjáról ismert, így ezek a városokban, vidéki területeken a kullancsokat és az általuk közvetített kórokozókat közvetlenül az emberek és háziállataik közelébe juttathatják. Másfelől, vannak olyan kullancsgazdák (nagyvadak, ragadozók), amelyek csak kisebb távolságban hordoznak, terjesztenek kullancsokat, sőt ebben is korlátozhatják őket természetes és ember alkotta akadályok. A kullancs közvetítette kórokozók gyorsabb vagy lassabb terjedésének mintázatai tehát meglehetősen összetettek, és az ebben szerepet játszó okok teljességükben nem ismertek. Ehhez az is hozzájárul, hogy az utazási, kereskedelmi, állattartási szokások átalakulásával (a globalizáció és egyéb trendek nemkívánatos következményeként) e vírusok, baktériumok és paraziták manapság nagyobb eséllyel bukkanhatnak fel "evolúciós szempontból hirtelen" újabb földrajzi térségekben, vagy akár újabb gazdafajokban is.

Az értekezésben szereplő vizsgálatok célja az volt, hogy hozzájáruljanak a kullancs- és óvontagfajok, valamint az általuk közvetített bakteriális és egysejtű kórokozók rendszertana, fent említett komplex (tér- és időbeli) előfordulási és terjedési mintázata, illetve a kapcsolódó öko-járványtani tényezők (élőhely típus, gazda- és rezervoár spektrum, terjedési módok) ismeretéhez. Nem hangsúlyozható eléggé, hogy az elért tudományos eredmények – két fajleírás, egy cikk és egy könyvfejezet kivételével – csapatmunkából születtek, amelynek során a siker záloga a résztvevők szakmai tapasztalatokon nyugvó nélkülözhetetlen hozzájárulása volt.

1. Fontosabb rövidítések

bp = bázispár (illetve nukleotid)

cf. = hasonló

CI = konfidencia intervallum

COI, cox1 = citokróm-c oxidáz 1-es alegység

Ct = küszöbciklus valós idejű PCR-ben

ML = Maximum Likelihood

PCR - polimeráz láncreakció

RLB - reverz blot hibridizáció

SEM - szkennning elektronmikroszkóp

s.l. = sensu lato

vö. = vesd össze

vs. = versus (valamivel szemben)

Madárfajok	Denevérfajok
ACR ARU = <i>Acrocephalus arundinaceus</i>	BBAR = <i>Barbastella barbastellus</i>
ACR PAL = <i>Acrocephalus palustris</i>	ESER = <i>Eptesicus serotinus</i>
ACR SCH = <i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	MALC = <i>Myotis alcaethoe</i>
ACR SCI = <i>Acrocephalus scirpaceus</i>	MBEC = <i>Myotis bechsteinii</i>
ANT TRI = <i>Anthus trivialis</i>	MBLY = <i>Myotis blythii</i>
CAR CHL = <i>Carduelis chloris</i>	MCAP = <i>Myotis capaccini</i>
COC COC = <i>Coccothraustes coccothraustes</i>	MDAS = <i>Myotis dasycneme</i>
EMB CIT = <i>Emberiza citrinella</i>	MDAU = <i>Myotis daubentonii</i>
EMB SCH = <i>Emberiza schoeniclus</i>	MEMA = <i>Myotis emarginatus</i>
ERI RUB = <i>Erithacus rubecula</i>	MMYO = <i>Myotis myotis</i>
LAN COL = <i>Lanius collurio</i>	MNAT = <i>Myotis nattereri</i>
LOC FLU = <i>Locustella fluviatilis</i>	MSCH = <i>Miniopterus schreibersii</i>
LOC LUS = <i>Locustella luscinioides</i>	PAUR = <i>Plecotus auritus</i>
LOC NAE = <i>Locustella naevia</i>	PAUS = <i>Plecotus austriacus</i>
LUS LUS = <i>Luscinia luscinia</i>	REUR = <i>Rhinolophus euryale</i>
LUS MEG = <i>Luscinia megarhynchos</i>	RFER = <i>Rhinolophus ferrumequinum</i>
PAR MAJ = <i>Parus major</i>	RHIP = <i>Rhinolophus hipposideros</i>
PHY COL = <i>Phylloscopus collybita</i>	RMEH = <i>Rhinolophus mehelyi</i>
PHY SIB = <i>Phylloscopus sibilatrix</i>	
PRU MOD = <i>Prunella modularis</i>	
SYL ATR = <i>Sylvia atricapilla</i>	
SYL COM = <i>Sylvia communis</i>	
SYL CUR = <i>Sylvia curruca</i>	
SYL NIS = <i>Sylvia nisoria</i>	
TRO TRO = <i>Troglodytes troglodytes</i>	
TUR ILI = <i>Turdus iliacus</i>	
TUR MER = <i>Turdus merula</i>	
TUR PHI = <i>Turdus philomelos</i>	

2. Bevezetés és szerkesztési, szóhasználati szempontok

A doktori műben találhatóak olyan részek (Anyag és módszer, fejezetenkénti Előzmények), amelyek csak a lényegyet emelik ki: további részletek az eredeti közleményekben olvashatóak. Fontos figyelembe venni azt is, hogy a fejezetek nem a vonatkozó közlemények időrendi sorrendjében követik egymást, hanem témájuk szerint. Így előfordulhat, hogy egy hátrébb szereplő fejezet még nem épít az azt megelőző eredményeire.

A szövegben helyenként olyan kifejezések is előfordulnak, amelyek kevésbé ismertek vagy a szokásostól eltérő jelentéstartalommal szerepelnek, így rövid magyarázatra szorulnak. A kullancsoknak és óvantageknak mint vérszívó ízeltlábú vektoroknak ún. potenciális vektorszerep tulajdonítható, ha egy kórokozó DNS-ét hordozzák, de a kórokozó szempontjából átvivő képességük (vektorkompetenciájuk) még nem ismert. Ezt a potenciális vektorszerepet akkor szokták említeni, ha (a) az állatok környezetéből (növényzetről) gyűjtött gazdakereső, abban a fejlődési stádiumban még vért nem szívott kullancs hordoz kórokozót (illetve annak DNS-ét), vagy – a vektor potenciál "gyengébb jeleként" – (b) ha a gazdáról gyűjtött, tehát a gazda vérért tartalmazó kullancsban/óvantageban van jelen a kórokozó. Ez utóbbi megítéléshez fontos tudni, hogy (c) a kullancsok jellemzően ún. biológiai vektorok (tehát ha kompetens vektorai egy adott kórokozónak, azzal szöveteik fertőződnek). Ellenben, (d) ha nem fertőződnek egy vérszíváskor felvett kórokozóval, mert nem vektorai annak, úgy – akár rövid időn belül – megemészti azt (tehát ez utóbbi esetben ha parasitaemiás vagy bacteriaemiás szakban lévő gazdáról vért szívott kullancsot gyűjtünk, vektor potenciál hiányában PCR negatívnak fogjuk találni). Bár a vizsgálatok többségében DNS alapú azonosítás történt, a szakirodalmi adatok szerint ez kórokozó-kimutatásként értelmezhető (ha nincs is mindenhol szó szerint odáírva, hogy csak molekuláris módszert alkalmaztunk, kenetkészítést vagy tenyésztést nem).

A járványtan (járványtani jelentőség) ebben a szövegösszefüggésben nem tömeges fertőződésre vagy annak lehetőségére vonatkozik, hanem az adott kórokozó átvitelének körülményeire, módjára, feltételeire. Az öko-járványtan fontos aspektusa az értekezés vizsgálatának. Ez az új tudományterület olyan környezeti, ökológiai szempontok szerint értelmezi az – ez esetben kullancs és óvantage közvetítette kórokozókval való – fertőződés kockázatát, amelyek befolyásolják a kórokozók és a rájuk fogékony gazda egyedek, vektorok tér- és időbeli eloszlását. Ilyen tényezők a földrajzi közelség vagy éppen izoláció, az élőhely vegetáció szerint vett típusa, az éghajlati viszonyok, továbbá a nappalok hosszának, és – a kullancsok mikrokozonyzetében nehezen mérhető – hőmérsékletnek, páratartalomnak a napi és évszakos változása.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listájában megadtam a vonatkozó fejezetek számát, és ezekre a közleményekre a doktori műben főként a fejezetszám alapján hivatkoztam. Az értekezéshez felhasznált cikkek angol nyelven jelentek meg, és egyes illusztrációk, főként törzsfák a szövegben az eredeti, publikált (angol nyelvű) formájukban szerepelnek. Ezek az ábrák a fajnevek írásmódja is az eredeti közleményben megjelent formát tükrözi (döntve vagy sem). A denevérek fajnevét inkább csak latinul, a madarakét több helyen magyarul is megadtam, amennyiben ismertebb fajról van szó. A szövegben az elsődleges írásmód az állatorvos-tudományi hagyományoknak megfelelően a tudományos (latinos) formát követi, bár a közhasználatú szakmai kifejezésekben fonetikus átírat is előfordul. A genus ill. magasabb taxonok tulajdonnévként nagy kezdőbetűvel, gyűjtőfogalomként kis kezdőbetűvel szerepelnek. A morfológiai képletek megnevezésekor – több lehetőség esetén – igyekeztem figyelembe venni a hazai (Babos, 1965) és a nemzetközileg legelfogadottabb terminológiát egyaránt (például felületi szőr vs. serte).

3. Anyag és módszer

3.1. Mintagyűjtési módszerek

A kullancsokat **növényzetről** az ún. *dragging-flagging* módszerrel gyűjtöttük. Ehhez legtöbbször 70 cm × 90 cm méretű fehér törülközöt használtunk, amelyet egységnyi hosszúságú, kb. 100 m-es ún. *transect*-ekben ("élőhelysávokban") húztunk végig, és 20-30 másodpercenként eltávolítottuk róla a kullancsokat. Az ismételt kullancsgyűjtést helyszínenként azonos napszakban és lehetőleg azonos időpontban végeztük, ugyanazon az adott számú *transect*-en.

A kullancsokat és óvtagokat gazdáikról vékony hegyű csipesszel távolítottuk el. Ehhez a **denevéreket** barlangok bejáratánál Ecotone hálóval (Gdynia, Lengyelország) fogtuk el (2 m hosszú, 2,5 m magas, 14 × 14 mm lyukátmérővel). A denevéreket ürülékgyűjtéshez steril papírzacskóban tartottuk; mintagyűjtés és adatrögzítés után szabadon engedték.

A kullancsokat **madarokról** főként az Ócsai Madárvártán, a fentihez hasonló hálóval (amely 12 m hosszú volt, 16 × 16 mm lyukátmérővel) gyűréshez befogott madaraktól gyűjtöttük. Az ektoparazitákat 70%-os vagy 96%-os etanolban szobahőmérsékleten tároltuk.

A kullancs fertőzött madaraktól esetenként < 20 µl vért vettünk a szárnyvénából (*vena brachialis*) vékony tű és 1 ml-es fecskendő (22-23 G, Omnican) segítségével. A vérmintákat további állatfajoktól (kutya, szarvasmarha stb.) a szakma szabályai szerint vettük, és EDTA tartalmú csőben, -20°C-on lefagyasztottuk.

3.2. Morfológiai fajhatározás

A kullancs és óvtagfajokat már publikált standard határozókulcsok és leírások, képek alapján azonosítottuk (Babos, 1965; Feider, 1965; Hillyard, 1996). A képeket VHX-5000 (Keyence Co., Osaka, Japán) digitális mikroszkóppal készítettük.

3.3. DNS kivonás

A kullancsok, óvtagok felületét – darabolás előtt – detergens vagy 10% nátrium-hipoklorit alkalmazásával tisztítottuk. A kullancsokból és a vérmintákból a DNS-t a "QIAamp DNA Mini Kit"-tel (QIAGEN, Hilden, Németország) vontuk ki, a gyártó előírásait követve. A kullancsokból való DNS kivonáshoz szövetoldó pufferben minimum 8 órás emésztést alkalmaztunk (56 °C-os inkubáció proteínáz-K-val). Az ürülék DNS-t "QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit" (QIAGEN, Hilden, Németország) segítségével vontuk ki. Minden együtt kivont 23 mintához egy extrakciós kontrollt használtunk, hogy PCR negativitása esetén a keresztszennyeződést kizárjuk.

3.4. PCR módszerek: 3.4.1.-2. táblázat (a közlemények és hivatkozásaik alapján)

3.5. Filogenetikai vizsgálatok

A szekvenciákat a GénBank adataihoz az NCBI BLAST programmal (National Institutes of Health, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) hasonlítottuk. A törzsfák készítéséhez génbanki – lehetőleg publikált – szekvenciákat úgy választottunk, hogy saját szekvenciáinkkal közel 100%-ban illeszkedjenek (= "coverage"). A filogenetikai vizsgálatokat MEGA 6.0 programmal végeztük (Neighbor-Joining, Maximum Likelihood törzsfa), annak modell szelekciója alapján.

3.6. Leggyakrabban alkalmazott statisztikai módszerek

Egy kullancsfaj abundanciáját úgy számoltuk ki, hogy fejlődési alakjaik illetve adultjaik standardizált területen (például három darab, 1×100 m-es élőhely sávon, ún. *transect*-en) gyűjtött egyedeinek számát százalékos arányban fejeztük ki az összes kullancsfaj hasonló adatához képest. A százalékos értékek megbízhatósági intervallumát (CI) 95%-os szinten számítottuk ki. A prevalencia adatokat Fisher-féle egzakt próbával hasonlítottuk össze, két adatsor összefüggését a Spearman rangkorreláció segítségével, a normál eloszlású értékek átlagát pedig *t*-teszttel (szignifikancia szintje: $P < 0,05$).

3.4.1. táblázat. Kullancs és óvontag taxonómiai (A-B), illetve kórokozó kereső (C-H) PCR módszerek oligonukleotid (primer, próba) szekvenciái és paraméterei.

PCR jele	CÉLCSOPORT	GÉN (amplikon)	PRIMEREK, PRÓBÁK (5'-3')	bevezető denaturáció	ciklus denaturáció	ciklus anneálás	ciklus extenzió	végző extenzió	ciklus-szám
A	Ixodidae, Argasidae	cox1 (710 bp)	LCO1490 (GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G) HCO2198 (TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA)	95 °C, 5m	94 °C, 40s	48 °C, 1m	72 °C, 1m	72 °C, 10m	40
B	Ixodidae, Argasidae	16S rRNS gén (460 bp)	16S+1 (CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG) 16S-1 (CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T)	95 °C, 5m	94 °C, 40s	51 °C, 1m	72 °C, 1m	72 °C, 10m	40
C	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	msp2 (77 bp)	ApMSP2f (ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT) ApMSP2r (TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA) ApMSP2p (FAM-TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG-HEX)	95 °C, 20s	95 °C, 3s	60 °C, 30s	-	-	40
D	Anaplasmataceae	16S rRNS (350 bp)	EHR16SD (GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC) EHR16SR (TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC)	95 °C, 10m	95 °C, 30s	55 °C, 30s	72 °C, 45s	72 °C, 5m	40
E	<i>Rickettsia helvetica</i>	23S rRNS (65 bp)	Rickhelv.147f (TTT GAA GGA GAC ACG GAA CAC A) Rickhelv.211r (TCC GGT ACT CAA ATC CTC ACG TA) Rickhelv.170p (6FAM-AAC CGT AGC GTA CAC TTA-MGBNFQ)	50 °C, 2m 95 °C, 10m	95 °C, 15s	60 °C, 1m	-	-	45
F	Rickettsiaceae	gltA (74 bp)	CS-F (TCG CAA ATG TTC ACG GTA CTT T) CS-R (TCG TGC ATT TCT TTC CAT TGT G) CS-P (FAM-TGC AAT AGC AAG AAC CGT AGG CTG GAT G-BHQ)	95 °C, 20s	95 °C, 3s	60 °C, 30s	-	-	60
G	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	flagellin (87 bp)	B.398f (GGG AAG CAG ATT TGT TTG ACA) B.484r (ATA GAG CAA CTT ACA GAC GAA ATT AAT AGA) B.421p (FAM-ATG TGC ATT TGG TTA TAT TGA GCT TGA TCA GCA A-TAMRA)	95 °C, 10m	95 °C, 15s	60 °C, 1m	-	-	40/45
H	<i>Bartonella</i> sp.	gltA (96 bp)	Bart.738f (GTG CTA ATC TTG CAT GTA TT) Bart.831r (GTA ACA TTT TTA GGC ATG CTT CAT TA) Bart.772p (6-FAM-AGC TGG TCC CCA AAG GCA TGC AA-TAMRA)	50 °C, 2m 95 °C, 10m	95 °C, 15s	60 °C, 1m	-	-	40

3.4.2. táblázat. Kórokozó azonosító (I-R) konvencionális PCR módszerek* oligonukleotid (primer) szekvenciái és paraméterei.

PCR jele	CÉLCSOPORT	GÉN (amplikon)	PRIMEREK, PRÓBÁK (5'-3')	bevezető denaturáció	ciklus denaturáció	ciklus anneálás	ciklus extenzió	végző extenzió	ciklus-szám
I	Rickettsiaceae	gltA (380 bp)	RpCS877p (GGG GGC CTG CTC ACG GCG G) RpCS1258n (ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A)	95 °C, 5m	95 °C, 20s	48 °C, 30s	72 °C, 1m	72 °C, 5m	40
J	Rickettsiaceae	gltA (790 bp)	CS477f (GGA AGC AGA CTA CGA ACT TA) CS1273r (GAT AAC CAG TGT AAA GCT GT)	98 °C, 3m	98 °C, 10s	56 °C, 30s	72 °C, 30s	72 °C, 5m	35/45
K	Piroplasmák	18S rRNS (500 bp)	BJ1 (GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG) BN2 (TAG TTT ATG GTT AGG ACT AGG)	95 °C, 10m	95 °C, 30s	54 °C, 30s	72 °C, 40s	72 °C, 5m	40
L	Piroplasmák	cox1 (950 bp)	Bab_For1 (ATW GGA TTY TAT ATG AGT AT) Bab_Rev1 (ATA ATC WGG WAT YCT CCT TGG) Bab_For2 (TCT CTW CAT GGW TTA ATT ATG ATA T) Bab_Rev2 (TAG CTC CAA TTG AHA RWA CAA AGT G)	95 °C, 1m	95 °C, 15s	45 °C, 30s	72 °C, 1m	72 °C, 10m	35
M	Kérődzők <i>Anaplasma</i> -fajai	msp4 (850 bp)	MSP45 (GGG AGC TCC TAT GAA TTA CAG AGA ATT GTT TAC) MSP43 (CCG GAT CCT TAG CTG AAC AGG AAT CTT GC)	95 °C, 5m	95 °C, 30s	59 °C, 30s	72 °C, 45s	72 °C, 5m	40
N	<i>Ehrlichia</i>	16S rRNA (1400 bp)	EE-1 (TCC TGG CTC AGA ACG AAC GCT GGC GGC) EE-2 (AGT CAC TGA CCC AAC CTT AAA TGG CTG)	95 °C, 5m	95 °C, 30s	69 °C, 30s	72 °C, 45s	72 °C, 5m	40
O	<i>Neoehrlichia</i>	16S rRNA (1050 bp)	16SCNM_for (GTG GCA GAC GGG TGA GTA AT) 16SCNM_rev (TGC AGC ACC TGT GTA AGG TC)	95 °C, 5m	95 °C, 30s	60 °C, 1m	72 °C, 50s	72 °C, 7m	35
P	<i>Neoehrlichia</i>	groEL (800 bp)	NeoeGroELFw (CAG GTG AAG CAC TAG ATA AGT CCA) NeoeGroELRv (ACA GCA GCA ACA TGC AAT CCA)	95 °C, 5m	95 °C, 30s	54 °C, 1m	72 °C, 50s	72 °C, 7m	35
Q	<i>Wolbachia</i>	16S rRNA (650 bp)	WOLB-F (TAT AGG AAT CTA CCT AGT AG) EHR16SR (TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC)	95 °C, 5m	95 °C, 30s	48 °C, 40s	72 °C, 1m	72 °C, 7m	35
R	<i>Anaplasmataceae</i>	16S rRNA (1200 bp)	Ana16SF (TTA GTG GCA GAC GGG TGA GTA ATG) Ana16SMR (CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TTT GC); Ana16SM (GCA AAC AGG ATT AGA TAC CCT GGT AG) Ana16SRR (TGA CGG GCA GTG TGT ACA AGA CCC GAG)	95 °C, 5m; 95 °C, 5m	95 °C, 30s; 95 °C, 30s	57 °C, 30s; 58 °C, 30s	72 °C, 1m; 72 °C, 1m	72 °C, 5m; 72 °C, 5m	40 40

* A konvencionális PCR reakcióelegy (25 µl) a következő összetevőkből állt: 0,5 vagy 1 U (0,1 vagy 0,2 µl) HotStarTaq Plus DNS polimeráz, 2,5 µl 10x CoralLoad reakciópuffer (benne 15 mM MgCl₂), 0,5 µl PCR nukleotid mix (egyenként 0,2 mM), 0,5 µl (1 µM végső koncentráció) mindkét primerből, 15,8 vagy 15,9 µl ddH₂O és 5 µl DNS minta.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1. Tudományra új kullancsfajok

4.1.1. Az *Ixodes ariadnae* Hornok, 2014 jellemzése

Előzmények

Európában eddig két, denevérekre mint gazdákra specializálódott kullancsfaj volt ismert: az *Ixodes vespertilionis* Koch, 1844 és az *I. simplex* Neumann, 1906 (Nosek és Sixl, 1972). A 2011-től végzett hazai, barlangi kullancsgyűjtések során, amelyek elsődleges célja kórokozó-kimutatás volt (Hornok és mtsai, 2012a), felfigyeltem rá, hogy egyes példányok mindkét már leírt európai denevérkullancs-fajtól különböznek. Ezért jelen vizsgálatunk elsődleges célja az volt, hogy ezeket a morfológiailag eltérő példányokat részletesebb vizsgálatnak vessük alá – beleértve mitochondriális markereik szekvencia- és filogenetikai elemzését – és amennyiben külön fajnak bizonyul, leírjam. Másodsorban a gyűjtött barlangi kullancsok tér- és időbeli előfordulásáról, azaz a haplotípusok távoli barlangokhoz köthető (így egymástól földrajzilag elválasztott, allopatrikus) eloszlásáról illetve szezonális aktivitásáról is igyekeztünk adatokat gyűjteni.

Rendszertani összefoglaló

Arthropoda törzs, Arachnida osztály, Acari alosztály, Ixodidae család, *Ixodes* nem

Diagnózis

Közepes méretű (vérszívott nőstény: 6-7 mm), a Prostriata csoportba tartozó kullancsfaj. A lábak hosszúak, a tapogatók rövidek, a hypostoma középhosszú. A pajzs lekerekített, széles hatszögletű, hátul ívelt, mély nyaki barázdákkal. A szőrözöttség felül és alul is ritka.

Típuspéldányok és származási helyük

Holotípus (#1): nőstény, a Leány-barlangból (Pilis hegység) (gyűjtötte Angyal D., március 31, 2012). Paratípusok: (#2) nympa, nimfadenevérről (*Myotis alcathoe*), a Pisznice-barlangból (Gerecse hegység) (gyűjtötte Kováts D., augusztus 25, 2012); (#3)-(#6) három nőstény a Leány-barlangból és egy nőstény a Legény-barlangból (Pilis hegység) (gyűjtötte Angyal D., március 31, 2012); (#7)-(#9) három nőstény a Leány-barlangból (Pilis hegység) (gyűjtötte Hornok S., március 24, 2013); (#10) nympa barna hosszúfülű denevérről (*Plecotus auritus*), a Szopláki-ördöglyukból (Pilis hegység) (gyűjtötte Kováts D., április 6, 2012); (#11) nympa hegyesorrú denevérről (*Myotis blythii*), a Szopláki-ördöglyukból (Pilis hegység) (gyűjtötte Kováts D., szeptember 4, 2012); (#12) láva nimfadenevérről (*Myotis alcathoe*), Alsóperéről (Bakony hegység) (gyűjtötte Kováts D., július 27, 2013).

Tárolásuk (alkoholban): a holotípus és a #2, #4-6 paratípusok, az Állatorvostudományi Egyetem Parazitológiai és Állattani Tanszékén. A #8-10 paratípusok a Magyar Természettudományi Múzeum Talajzoológiai gyűjteményében lesznek elhelyezve. A #3, #7, #11-12 paratípusokat DNS kivonásra és molekuláris-filogenetikai összehasonlításra használtuk.

Morfológia és egyéb adatok (a méretek mm-ben megadva)

Nőstény (eredeti leírás, vérszívott példány alapján)

Hosszúság 6. A lábak hosszúak (tarsus I.: 1,5). Haller-féle szerv nyitott, hosszúkas, egybefüggő, 11 sertével három csoportban (4.1.1.1. ábra). A basis capitulin posterolaterálisan lapos perem, a hátsó szél dorsalis peremmel (maximális szélesség 0,5). A tapogatók rövidek (0,44), szélesek a II.-III. íz jól felismerhető találkozásánál. A hypostoma középhosszú (0,35), 10 harántsorban széles fogakkal, ventralisan négy hosszanti vonalban. A scutum lekerekített, széles hexagonalis, alak index (hossz: szélesség) 1,2. Az idiosoma ritka szőrzettel fedett dorsalisán és ventralisan. A csípők convexek posterolaterálisan,

domború felszínnel. Ivarnyílás a III. csípők között. Az analis barázda hátrafelé széttérő. A légzőnyílások lemeze ovális, szabálytalan körvonallal. A 4.1.1.2. ábrán nem vérszívott példány látható.

Hím (hat példány alapján, zárójelben az átlag) (4.1.1.2. ábra)

Az idiosoma hossza (a scapulák közötti felezőponttól a hátsó széléig) 3,01–3,59 (3,35), szélessége 2,2–2,6 (2,44), idiosoma hossz/szélesség arány 1,36–1,39 (1,37). A conscutum hosszúka, elliptikus, a közepe mögött a legszélesebb; hossza 2,95–3,53 (3,3), szélessége 1,7–2,06 (1,9) mm, hossz/szélesség aránya 1,71–1,74 (1,72). A conscutum hátsó felében sekély paramedialis barázdák és szétszórt, nagy bemélyedések találhatóak, az oldalsók körül világos elefántcsont színű minta. Az idiosoma ventralis felületén ritka szőrözöttség figyelhető meg. Az ivarnyílás vonallal (sclerotisatio) határolt, kissé a II. csípők előtt. A légzőnyílások lemeze enyhén ovális, excentrikus nyílással. Az analis barázda hátrafelé összetérő.

A gnathosoma hosszúsága (a tapogatók csúcsától a fejalap hátsó széléig) 0,53–0,635 (0,59), a basis capituli szélessége dorsalisán 0,34–0,41 (0,38), hossz:szélesség arány 1,55–1,57 (1,56). A basis capituli felül a tapogatók tövénél a legszélesebb, hátrafelé elkeskenyedő, széles U-alakú peremmel a gnathosoma elülső szélé mögött; hátsó szélé egyenes. Ventralisan a basis capituli trapezoid, hátrafelé keskenyedő. A tapogatók rövidek, hosszuk 0,33–0,39 (0,37), szélességük 0,14–0,165 (0,155), hossz:szélesség arányuk 2,35–2,37 (2,36). A tapogatóízek hossza: I. 0,04, II.–III. (határuk nem észrevehető) 0,31, IV. 0,04. A II.–III. íz medialisán ívelt és széles, oldalt egyenes. A tapogató szőrök elöl (IV. ízén) rövidek (0,03), leghosszabbak (0,1) középen oldalt, de a tapogatók szélességénél egyik sem hosszabb. A hypostoma lándzsahegy alakú, hosszúsága 0,24–0,26 (0,25), szélessége 0,08–0,1 (0,09), hosszúság:szélesség aránya 2,4–2,6 (2,5). A fogazottság gyenge, formulája 3/3.

A lábak hosszúak, méretük 7–8 (7,5). A csípők medialisán lekerekítettek, tövis nélküliek, kevés szőrrel (0,07–0,12). Az I. tarsus 1,7–1,9 (1,83). A Haller-féle szerv nyitott, egy feltűnő érzékszertével (0,07) oldalt az elülső gödör sensillák középső csoportjához képest.

Nympha (eredeti leírás, vérszívott példány alapján)

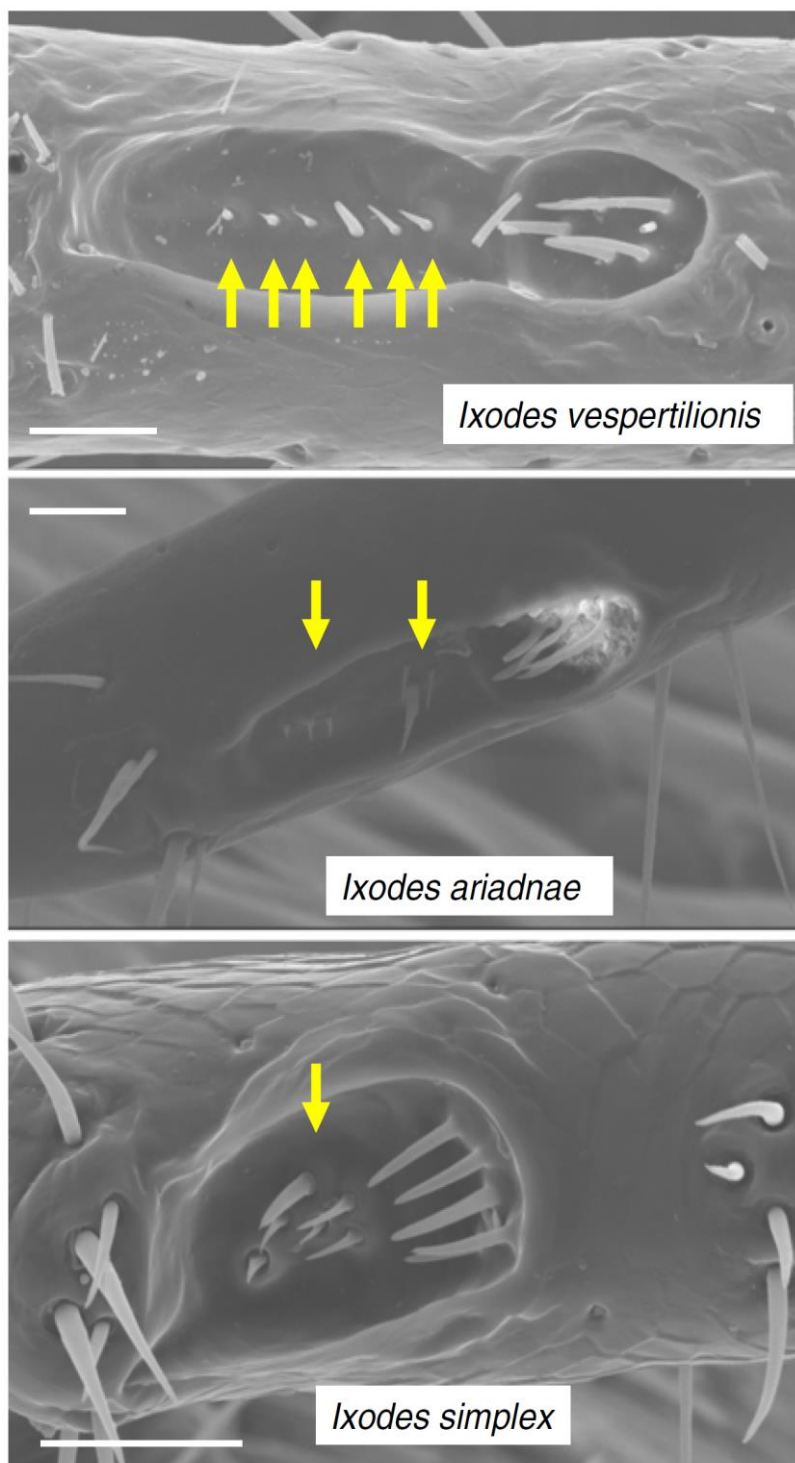
Teljes hossza 3. A lábak mérsékelten hosszúak (tarsus I.: 0,75). A basis capituli maximális szélessége 0,35. A tapogatók rövidek (0,2; II. + III. ízek: 0,125 + 0,075), szélesek a II.–III. íz jól felismerhető találkozásánál. A hypostoma középhosszú (0,13). A pajzs lekerekített, széles hexagonalis (hossza: 0,72, szélessége: 0,6, alak indexe 1,2). Az idiosoma dorsalisán és ventralisan is ritkán szőrözött. A légzőnyílások lemeze ovalis, szabálytalan körvonallal. A 4.1.1.3. ábrán nem vérszívott példány látható.

Lárva (4.1.1.3. ábra)

Az idiosoma hossza 1,1, szélessége 0,92, hossz/szélesség aránya 1,2. A pajzs ötszögletű, hátul fordított harang alakú, kevés a közepe előtt legszélesebb; hossza 0,43, szélessége 0,48, hossz/szélesség aránya 0,9. A pajzs felszíne egyenetlen, hullámos, főként posterolateralisan. A nyaki barázdák hosszúak, a scutum posterolateralis szélét a fordított harang alak konkáv részének legmélyebb pontja mögött érik el. A pajzsszőrök rövidek (0,02) elöl, hosszabbak (0,03) lateralisan, a legnagyobb szélesség közelében. Az alloscutum sertéi hátrafelé egyre hosszabbak (0,08-től 0,15-ig), leghosszabbak caudalisán, jóval az idiosoma mögé nyúlva. Ventralisan, a sternalis szőrök elöl rövidebbek, mint hátul (0,07 vs. 0,12); a preanalis szőrök hossza 0,12; a premarginalis és marginalis ventralis szőrök kissé rövidebbek elöl (0,12), mint hátul (0,14).

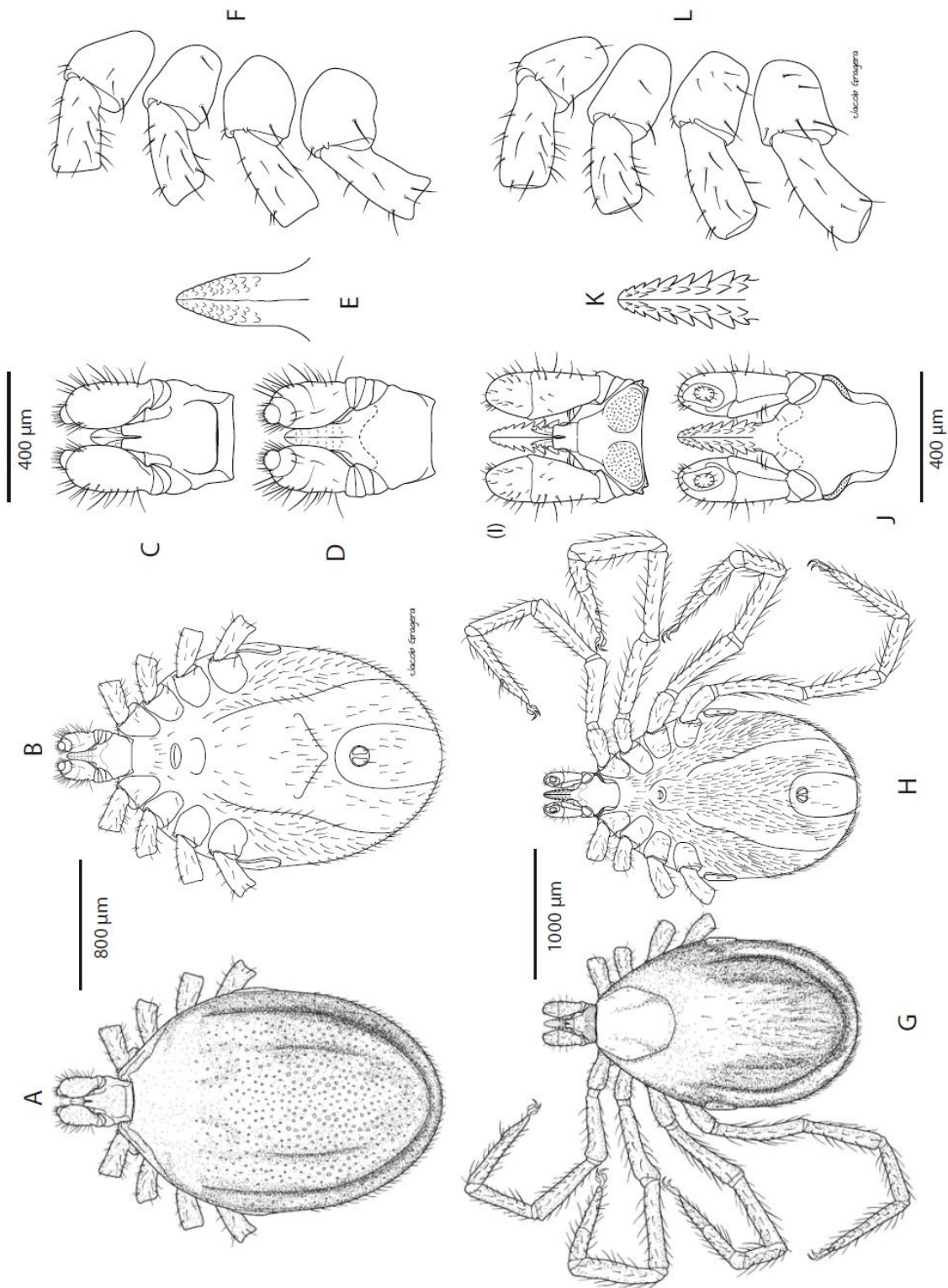
A gnathosoma hosszúsága (a tapogatók csúcsától a basis hátsó széléig) 0,28, a basis capituli szélessége dorsalisán 0,3, hossz:szélesség arány 0,93. A basis capituli dorsalisán háromszögletű, egyenes hátsó széllel. Ventralisan a basis capitulin két pár rövid (0,015) posthypostomalis szőr van. Alul, a fejalap hátsó szélé caudolateralisan lekerekített. A tapogatók rövidek és szélesek, oldalt egyenesek: hosszúságuk 0,2, szélességük 0,09, hossz:szélesség arányuk 2,2. A tapogató szőrei dorsalisán közepesen hosszúak (0,05), ventralisan rövidek (0,01–0,02) vagy hosszúak (0,07–0,08). A hypostoma kúp alakú, rövid (0,1), a fogképlet 2/2.

A lábak hosszúak (2–2,2). A csípők mediálisan keskenyedők és lekerekítettek, tövis nélküliek. Egy hosszú (0,1) szőr van a II. csípőn, egy rövid (0,025) és egy hosszú (0,1) szőr az I. és a III. csípőn. Az I. tarsus hossza 0,7.

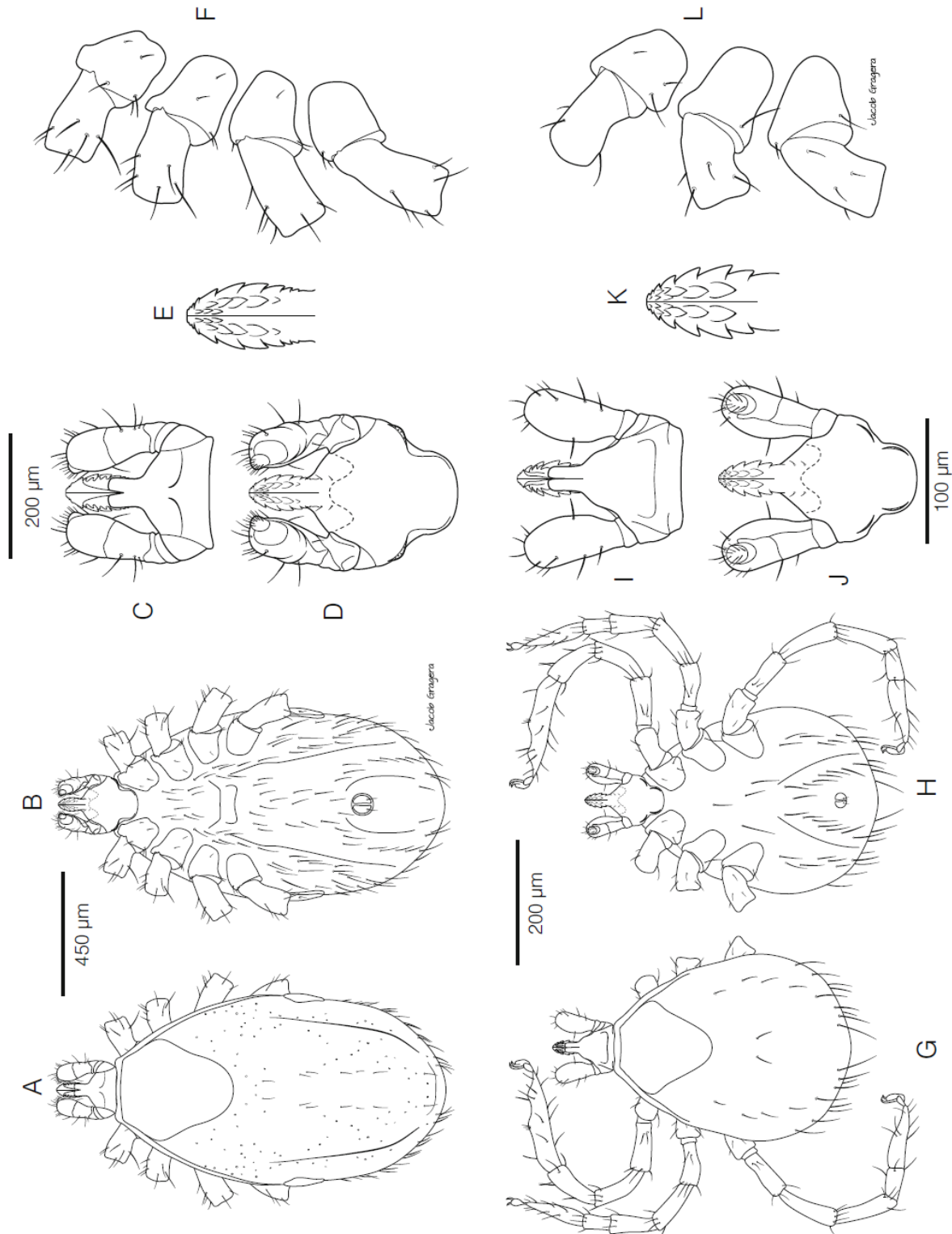


4.1.1.1. ábra. A három denevérkullancs-faj Haller-féle szerve (SEM), különös tekintettel az elülső gödör érzéksertéinek elrendezésére (nyilak). A fehér vonal 50 μm . (Hornok és mtsai, 2015a)

4.1.1.2. ábra. Az *Ixodes ariadnae* hím (A-F) és nőstény (G-L) morfológiája. Hím: A - habitus dorsalis nézet, B - habitus ventralis nézet, C - capitulum dorsalis nézet, D - capitulum ventralis nézet, E - hypostoma, F - csípők és trochanterek. Nőstény: G - habitus dorsalis nézet, H - habitus ventralis nézet, I - capitulum dorsalis nézet, J - capitulum ventralis nézet, K - hypostoma, L - csípők és trochanterek (forrás: Hornok, 2017c; rajzolta Jacob Gragera).



4.1.1.3. ábra. Az *Ixodes ariadnae* nympa (A-F) és lárva (G-L) morfológiája. Nympa: A - habitus dorsalis nézet, B - habitus ventralis nézet, C - capitulum dorsalis nézet, D - capitulum ventralis nézet, E - hypostoma, F - csípők és trochanterek. Lárva: G - habitus dorsalis nézet, H - habitus ventralis nézet, I - capitulum dorsalis nézet, J - capitulum ventralis nézet, K - hypostoma, L - csípők és trochanterek (forrás: Hornok, 2017c; rajzolta Jacob Gragera).



Differenciáldiagnózis

Az *I. ariadnae* nőtény összehasonlítását az *I. vespertilionis* és az *I. simplex* nőtényével a 4.1.1.1. táblázat tartalmazza.

4.1.1.1. táblázat. Az *Ixodes vespertilionis*, *I. ariadnae* sp. nov. és *I. simplex* nőtények morfológiai összehasonlítása. A méretek mm-ben vannak megadva.

Morfológiai bélyeg	<i>I. vespertilionis</i> *	<i>I. ariadnae</i> sp. nov.	<i>I. simplex</i> *
Max. méret (vérszívott)	10	7	4,5
Láb jellemzője	hosszú (tarsus I: 1,6)	hosszú (tarsus I: 1,5)	rövid (tarsus I: 0,73)
Fej alapi rész	- posterolateralisan csúcsos	- posterolateralisan csúcsos	- posterolateralisan nem csúcsos
	- hátul egyenes	- hátul enyhén görbül, peremmel	- hátul hullámos
Tapogató (II+III ízek)	hosszú, keskeny (0,39 + 0,22)	rövid, széles (0,28 + 0,16)	rövid (0,16 + 0,14)
II-III íz találkozási	felismerhető	felismerhető	nem felismerhető
Hypostoma	hosszú, karcsú fogak 15 haránt sorban, 6-8 hosszanti vonalban	közepes, széles fogak 10 haránt sorban, 4 hosszanti vonalban	rövid, széles fogak 8 haránt sorban, 4-6 hosszanti vonalban
Areae porosae	nagy, ovális, széles intervallum	nagy, ovális, kevésbé széles intervallum	nagy, keskeny intervallum
Pajzs szőrözöttség	anterolateralisan feltűnő	anterolateralisan kevés	anterolateralisan feltűnő
Pajzs hossz: szélesség arány	1,76/1,08 (kb. 1,6)	1,15/0,95 (kb. 1,2)	1,13/0,8 (kb. 1,4)
Idiosoma szőrözöttség	sűrű	ritka	sűrű
Csípők	hátul és kívül konkáv, felszín lapos	hátul és kívül konvex, felszín legömbölyített	hátul és kívül konkáv
Analís barázda	párhuzamos	hátul enyhén széttérő	hátul igen széttérő
Légzőnyílás	ovalis, szabályos körvonalú	ovalis, szabálytalan körvonalú	kerekded, széles

*A morfológiai jellemzők forrásai: Arthur (1956), Babos és Janisch (1958), Nosek és Sixl (1972).

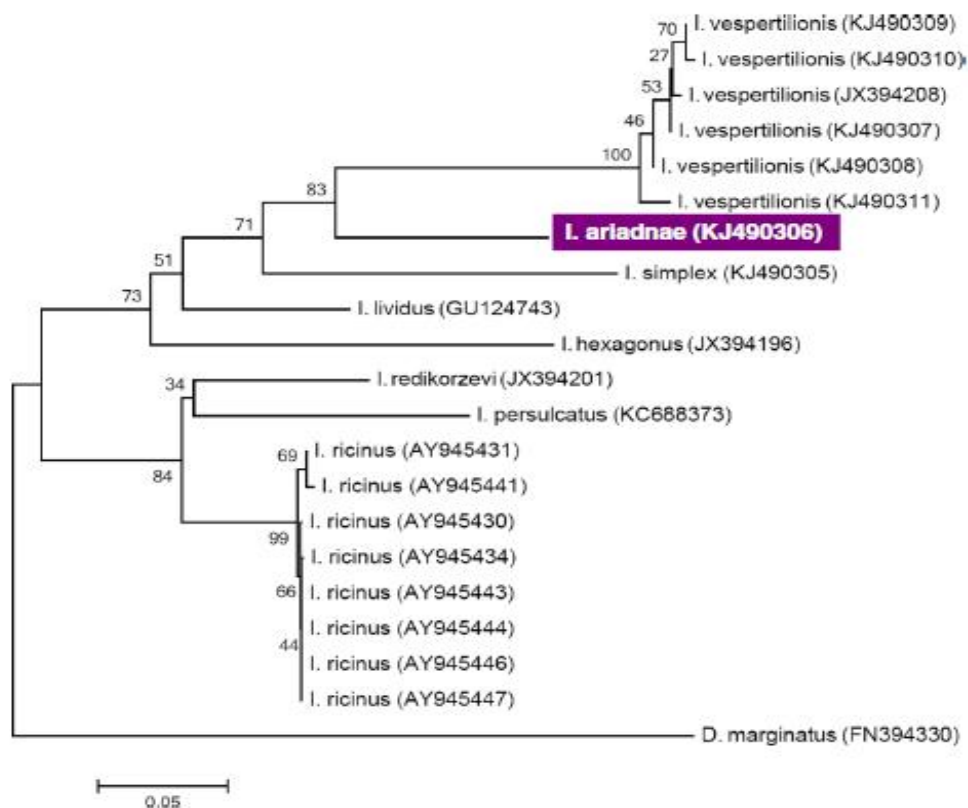
Az *I. vespertilionis* leírásai (Arthur, 1956; Feider, 1965) alapján e fajhoz képest az *I. ariadnae* sp. nov. hímjei az alábbi megkülönböztető jegyekkel rendelkeznek: a méret kisebb (3,4 mm vs. 4,7 mm); az oldalsó világos elefántcsont színű minta eltérő (vagyis az oldalak mentén hátrafelé vékonyodó, míg az *I. vespertilionis* esetében hátrafelé szélesedő); az ivarnyílás körül vonal (sclerotisatio) figyelhető meg és a második csípőköz előtt helyeződik (vs. mögötte az *I. vespertilionis* fajnál); a tapogató szőrei (főleg elöl) rövidek (30–100 µm vs. 100–200 µm az *I. vespertilionis* fajnál), tehát nem haladják meg a tapogató szélességét (vs. *I. vespertilionis*); a tapogatók laterálisan egyenesek (míg az *I. vespertilionis* esetében íveltek); a második csípő lekerekített (vs. szögletes az *I. vespertilionis* esetében). Az *I. simplex* hímjével összehasonlítva (Filippova, 1977), az *I. ariadnae* sp. nov. hímje nagyobb méretű (3,4 mm vs. 2,4 mm), a tapogatók laterálisan egyenesek (vs. hajlottak és kiszögellőek az *I. simplex* esetében), a lábak jóval hosszabbak (7–8 mm vs. 2–2,2 mm az *I. simplex* fajnál), és az *I. simplex* hímjére jellemző, 12 sertéből álló hátsó szegélysor a IV. csípőn az *I. ariadnae* sp. nov. esetében hiányzik.

Ami az *I. ariadnae* sp. nov. lárváját illeti az *I. vespertilionis* lárvával összehasonlítva: a scutum a közepe előtt a legszélesebb (*I. vespertilionis*: középen). A nyaki barázdák a scutum posterolateralis szélét a fordított harang alak konkáv részének legmélyebb pontja mögött érik el, szemben az *I. vespertilionis* lárvával (amelynél a nyaki barázdák a scutum posterolateralis szélét éppen a legmélyebb pontnál érik el: Arthur, 1956). Az *I. ariadnae* sp. nov. lárvájának tapogatói szélesek (hossz × szélesség: 200 × 90 μm), míg az *I. vespertilionis* lárvájának tapogatói előrefelé vastagodók, bunkó alakúak és keskenyebbek (200 × 70 μm: Arthur, 1956; Feider, 1965). Az *I. simplex* lárvájához képest (Feider, 1965) az *I. ariadnae* sp. nov. lárvája más alakú tapogatóval rendelkezik (lateralisan egyenes, medialisan ívelt vs. enyhén ívelt lateralisan és medialisan is az *I. simplex* esetében), tapogatóin a serték hosszabbak (10–80 μm vs. 10–30 μm az *I. simplex* fajnál) és lábai is hosszabbak (2–2,2 mm vs. 1 mm az *I. simplex* esetében).

Gén szekvenciák (molekuláris módszerek: A, B)

A mitochondrialis citokró-m-c oxidáz I-es alegység (cox1) génjének génbanki szekvenciája a KJ490306. Ennek filogenetikai viszonyait a 4.1.1.4. ábra mutatja. 16S rRNS gén szekvenciája: KM455969.

4.1.1.4. ábra. Az *I. vespertilionis* haplotípusok, az *I. ariadnae* és az *I. simplex* filogenetikai viszonyai más kullancsfajokhoz képest, a cox1 gén alapján.



Gazdafajok és földrajzi elterjedtség

Ismert gazdafajai a nimfadenevér (*Myotis alcaethoe*), a barna hosszúfülű denevér (*Plecotus auritus*), a hegyesorru denevér (*Myotis blythii*) és más *Myotis*-fajok. Földrajzi elterjedtségét Európában a 4.1.1.5. ábra mutatja.

4.1.1.5. ábra (túloldal). Az *Ixodes ariadnae* sp. nov. ismert európai előfordulása (fekete pöttyök: magyar- és németországi adatok, piros pötty: legutóbbi előkerülés Belgiumból; sávozott terület: a *Myotis bechsteinii* mint gazdafaj európai elterjedtsége).



Etimológia

Az új faj neve Ariadnéra utal, aki a labirintusok istennője a görög mitológiában. Az új fajhoz azért kapcsolódik, mert az első, illetve legtöbb példánya az Ariadne-barlangrendszerből került elő.

Nevezéktani háttér

A Zoológiai Nomenklatura Nemzetközi Kódjának (ICZN) 8.5-ös szekciója szerint az új fajt és nevének részleteit a ZooBank a következő élettudományi azonosító (LSID) alatt benyújtott adatok tartalmazzák: [zoobank.org/pub: F9432D03-627D-4D86-A307-D9A8E8300361](http://zoobank.org/pub:F9432D03-627D-4D86-A307-D9A8E8300361).

Megbeszélés

A barlangi és denevérekről gyűjtött *I. vespertilionis* kullancsok *cox1* génje jelentős, akár 11 bp eltérést mutatott hazánk különböző térségeiből származó minták esetén, míg az *I. ariadnae* sp. nov. négy szekvenciája nagyobb távolságban is azonos volt (a négy első hazai szekvencia esetén éppúgy, mint a magyar és belga minták között: 4.6.2. fejezet). Ez részben arra utal, hogy az *I. ariadnae* gazdafaj köre eltér az *I. vespertilionis* fajétól (és így azok vándorlási szokásai, távolságai is különböznek), amely utóbbiak a patkósorrú denevérek (*Rhinolophus* spp.) közül kerülnek ki (Ševčík és mtsai, 2010). Az *I. ariadnae* sp. nov. ezzel szemben más denevérfajok egyedéről került elő (*Myotis*, *Plecotus*). Az, hogy ez az új kullancsfaj elsősorban a *Myotis*-fajok élősködője, későbbi vizsgálatainkból is kiderült (4.5.2. fejezet).

Az *I. ariadnae* sp. nov. *cox1* szekvenciája csak 88%-ban illetve 86%-ban egyezett az *I. vespertilionis* és az *I. simplex* szekvenciáival (amelyek 85%-os egyezést mutattak egymással). Általánosságban véve, az azonos nembe tartozó kullancsfajok közötti *cox1* szekvencia azonosság a 70-94% tartományban szokott lenni (Lu és mtsai, 2013). Ennek megfelelően, az Európában eddig leírt két denevérkullancs fajjal összehasonlítva, az *I. ariadnae* sp. nov. mindössze 86-88%-os azonossága mellett szól, hogy önálló fajról van szó. Filogenetikailag ez az új faj közelebb áll az *I. vespertilionis* fajhoz, de külön csoportba tartozik, amit mérsékelten magas *bootstrap* érték (83%) is támogat (4.1.1.4. ábra). Ezt megerősíti, hogy az *I. ariadnae* sp. nov. nemcsak genetikailag tér el a másik két denevérkullancs-fajtól, hanem morfológiailag is (a lárva, nympa és adult stádiumban egyaránt), illetve gazdakörében (*I. ariadnae* sp. nov.: főként *Myotis* spp.; *I. vespertilionis*: jellemzően *Rhinolophus* spp.; *I. simplex*: szinte kizárólag *Miniopterus schreibersii*).

Következésképpen, ebben a vizsgálatban egy morfológiailag és genetikailag elkülönülő, más denevér gazdákhoz adaptálódott új denevérekullancs fajt találtunk és írtam le első alkalommal. Az új faj az *I. ariadnae* Hornok, 2014 nevet kapta. További molekuláris rendszertani vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy az új faj ökológiáját és gazdaspektrumát még szélesebb körben megismerjük.

4.1.2. Az *Ixodes collaris* Hornok, 2016 jellemzése

Előzmények

Euráziában 2015-re három denevérekullancs-faj széleskörű előfordulása vált ismertté. Ezek az *Ixodes vespertilionis* Koch, 1844, az *I. simplex* Neumann, 1906 és az *I. ariadnae* Hornok, 2014 (4.8.1. fejezet). Az *I. vespertilionis* faj morfológiai jegyeit mutató példányok között igen magas, a "fajelválasztó határként" ismert 6,1%-os *cox1* szekvencia eltérést (Lv és mtsai, 2014) többszörösen meghaladó (16%-os) különbséget találtunk a magyarországi és a vietnámi példányok között (4.8.1. fejezet). Újabb vizsgálatunk célja az volt, hogy részletesebb morfológiai elemzéssel igazoljuk: a hazai és a vietnámi haplotípusok esetében külön fajról van szó, majd az új fajt leírjam.

Rendszertani összefoglaló

Arthropoda törzs, Arachnida osztály, Acari alosztály, Ixodidae család, *Ixodes* nem

Diagnózis

Közepes méretű (vérszívott nőstény: kb. 7 mm), a Prostriata csoportba tartozó kullancsfaj. A pajzs hosszúság, fordított ötszög alakú (csúcsával hátrafelé), szélesen convex (csaknem lekerekített) caudolateralis széllel. A tapogatók hosszúak, a fej alapi része felülnézetben háromszög alakú, alul caudolateralisan gallérszerű peremmel. A lábak hosszúak, a csípőkön hosszú szőrökön kívül rövidek is vannak.

Típuspéldányok és származási helyük

Holotípus (#1): nőstény ex *Hipposideros pomona* (gyűjtve: Vietnám, 1080 m tengerszint feletti magasság, Ngoc Linh Nemzeti Park, Kon Tum körzet: 15.20598N, 107.7937E; gyűjtő Vuong Tan Tu; időpont 2014. szeptember 22.; tervezett elhelyezés: Magyar Természettudományi Múzeum, Talajzoológiai Gyűjtemény; hozzáférési szám HNHM-PED Ixo-00567).

Paratípus (#1): nőstény ex *Rhinolophus affinis* (gyűjtve: Vietnám, (418 m tengerszint feletti magasság, Ba Vi Nemzeti Park, Hanoi körzet: 21.08174N, 105.37534E; gyűjtő Vuong Tan Tu; időpont: 2010. július 25.; elhelyezve: Állatorvostudományi Egyetem, Parazitológiai és Állattani Tanszék; hozzáférési szám UNIVET-PAR-HS108).

Paratípus (#2): nympa ex *R. affinis* (gyűjtve: Vietnám, Phia Oac - Phia Den Nemzeti Park, Cao Bang körzet: 22.56327N, 105.87404E; gyűjtő Görföl Tamás, Estók Péter és Vuong Tan Tu; időpont 2014. október 20.; elhelyezve: Állatorvostudományi Egyetem, Parazitológiai és Állattani Tanszék; hozzáférési szám UNIVET-PAR-HS109).

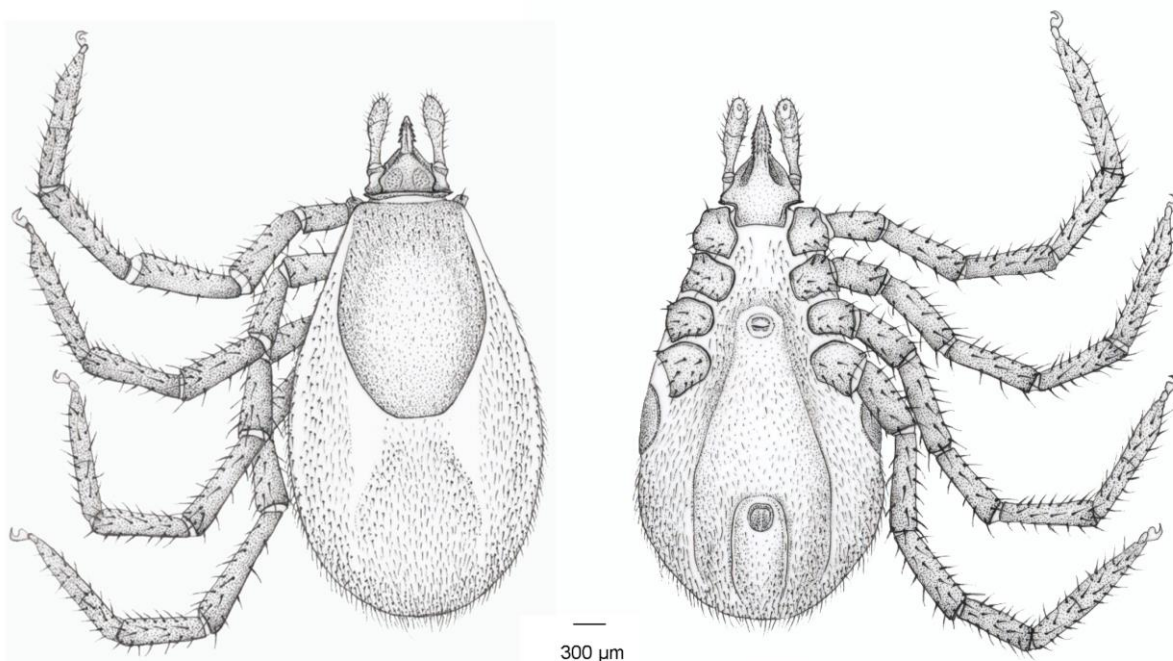
Paratípus (#3): nympa ex *R. affinis* (gyűjtve: Vietnám, Phu Lac közösség - Tuy Phong kerület, Binh Thuan körzet: 11.225N, 108.6854E; gyűjtő Vuong Tan Tu; időpont: 2015. december 7.; tervezett elhelyezés: Vietnámi Tudományos és Technológiai Akadémia, Ökológia és Biológiai Erőforrások Intézete; hozzáférési szám: IEBR-VN15-057).

A hím és a lárva leírásához kullancsokat gyűjtöttek Phia Oac mellett, a Phia Den Nemzeti Parkban (22.563611N, 105.874167E), Cao Bang tartományban (Vietnám) 2016. június 1.-én és 2017. november 17.-én; a két hím példányt barlangfalról, míg a két lárvát *R. affinis* denevérfajról (egy-egyet molekuláris vizsgálatra, egy-egy továbbit pedig morfometriai leírásra).

Morfológia és egyéb adatok (a méretek mm-ben megadva)

Nőstény (holotípus) (4.1.2.1. ábra)

Az idiosoma hossza (a vállcsúcsok távolságának felezőpontja és a hátsó szél között) 6. A pajzs hosszúság, fordított ötszög alakú (csúcsával hátrafelé), legszélesebb hosszanti felezővonalánál, hossza 2, szélessége 1,325 (hosszúság: szélesség arány 1,5); a pajzs széle konkáv anteriolateralisan, convex (csaknem lekerekített) caudolateralisan és hátul. A nyaki barázdák közepesen mélyek, a pajzs caudolateralis szélét kevéssel maximális szélessége mögött érik el. A pajzs elszórtan pontozott, ami elől jobban látható. A pajzsszőrök csak anteriolateralisan és a vállak között, kis számban vannak, rövidek ($< 0,05$). Az alloscutum szőrei sűrűn helyezkednek el, hosszabbak ($\geq 0,1$) a pajzs első fele közelében és az idiosoma oldalán; a hátsó szőrök a leghosszabbak ($> 0,12$). A ventralis idiosoma szőrök az ivarnyílás előtt rövidebbek ($< 0,1$), mögötte hosszabbak ($> 0,1$), a végbélnyílás körül is. Az ivarnyílás a III. csípők között helyeződik. A légzőnyílás lemeze ovális, excentrikus nyílással.



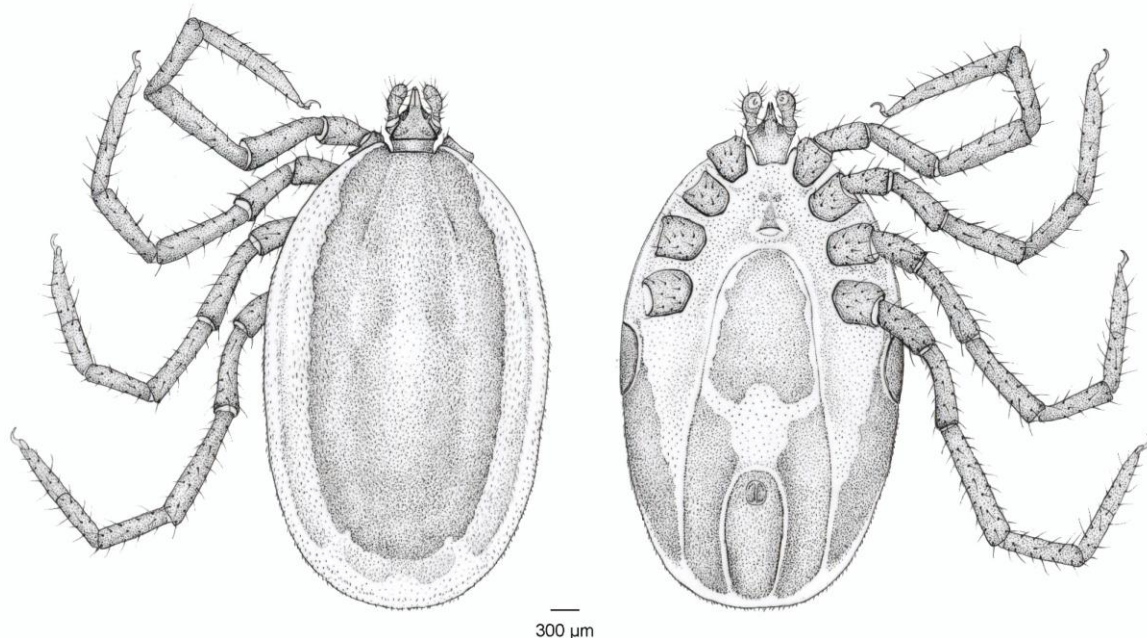
4.1.2.1. ábra. Az *Ixodes collaris* nőstény habitusrajzai: felül- és alulnézet (rajzolta: Murányi Dávid).

A gnathosoma hossza (a tapogatók csúcsától a fej alapi rész hátsó széléig) 1,08, a fejalap szélessége felül 0,77, hossz: szélesség arány 1,4. A basis capituli felülnézetben háromszög alakú, hátul kb. 0,05 vastag haránt irányú, felemelkedett peremmel, ami oldalt dorsoventralis irányban folytatódik. Az area porosa területét oldalról (a hátsó harántperemre merőlegesen) hosszanti redő határolja, ami előrefelé előbb széttérő, majd összetérő (közöttük a maximális távolság 0,56). Az areae porosae hosszabbak, mint amilyen szélesek, elől elvékonyodnak, jól elválasztottak (közöttük 0,1 széles sávval). Alulnézetben, a basis capituli caudolateralis szélein áttetsző, széles perem ("gallér"), amely csaknem horizontális helyzetű, és benyúlik az I. csípők fölé. A tapogatók karcsúak, hosszúságuk (méret: 0,84): felülről az I., II. és III. íz mérete 0,08, 0,47 illetve 0,29. A hypostoma 0,55 hosszú, 0,18 széles (hossz: szélesség arány 3), hegyes, kúp alakú, rajta megnyúlt fogak 3/3, majd 4/4 elrendezésben (csökkenő mérettel) a csúcsa felé.

A lábak hosszúak (a Haller-féle szerv hosszabb az I. tarsus legnagyobb szélességénél). A csípőkön nincs tövis (bár az I. csípő caudomedialisan enyhén kicsúcsosodik), de néhány hosszabb szőr mellett számos apró ($< 0,02$) található rajtuk. Az I. tarsus 1,25 hosszú. A Haller-féle szerv nyitott, megnyúlt. Elülső (a tarsalis vég felőli) gödrének sensillái csoportban láthatóak, egy feltűnően hosszú érzékszőrrel.

Hím (4.1.2.2. ábra.)

Az idiosoma hossza 4,49, szélessége 2,78, hossz/szélesség aránya 1,61. A conscutum közepén sötétbarna, kívül világosabb, hosszúkás, elliptikus, legszélesebb hosszának felezője előtt (4.1.2.2. ábra). A pajzs hossza 4,2, szélessége 2,45, hossz/szélesség aránya 1,71. Elöl mély cervicalis barázdák, hátul sekély paramedialis barázdák és elszórt pontozottság.



4.1.2.2. ábra. Az *Ixodes collaris* hímjének habitusrajzai: felül- és alulnézet (rajzolta: Murányi Dávid).

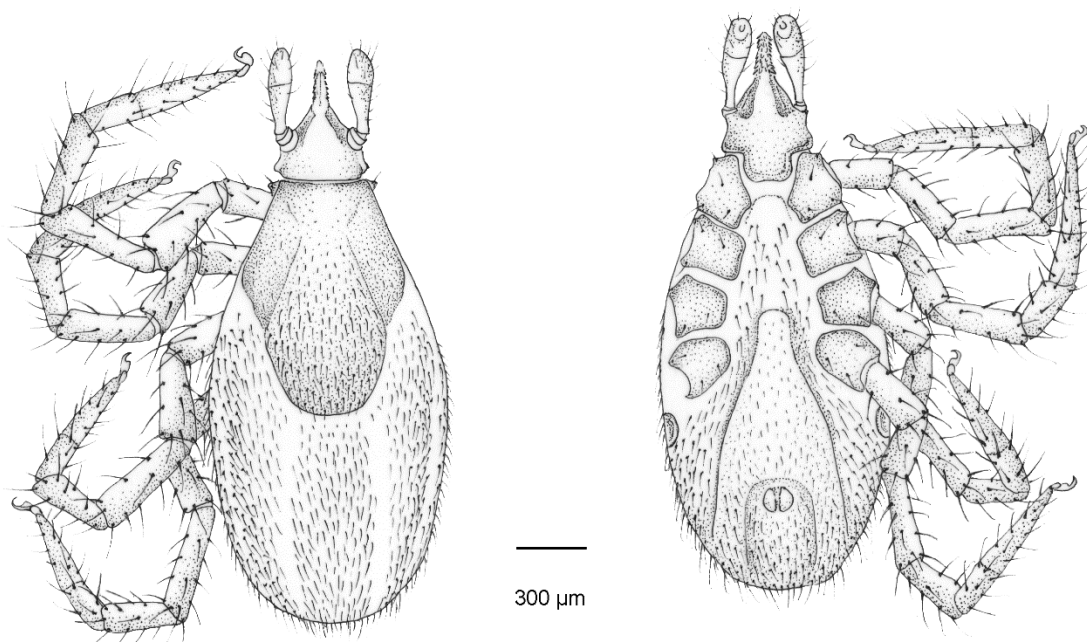
Az idiosomán ventralisan: ivarnyílás a második-harmadik csípők közötti hézag magasságában, körülötte világos (elefántcsont) szín, elszórt pontozottság. A légzőnyílások enyhén oválisak (hossz/szélesség arányuk 1,23), excentrikus nyílással. A világos szín a végbélnyílás előtt ovális, hosszúkás. Az analis lemez ovális, megnyúlt, legszélesebb hosszanti felezőjénél. Az adanalis lemezek másfélszer hosszabbak, mint az analis lemez. A középlemez elöl lekerekített, hosszabb, mint amilyen széles.

Gnathosoma: hossza (a tapogatók csúcsától az alap hátsó széléig) 0,78, az alap szélessége felül 0,48, hossz/szélesség aránya 1,63. A fej alapi rész dorsalisán legszélesebb a tapogatók tövéénél, hátrafelé kiszélesedő (trapezoid), oldalt és hátul kiemelkedő sötét peremmel (sclerotisatio). Ventralisan a fej alapi rész trapéz alakú, hátrafelé összetérő. A tapogatók relatíve rövidek, hosszuk (felülnézetben) 0,53, szélességük 0,21, hossz/szélesség arányuk 2,52. Az első tapogató íz 0,04, a II-III. (kevésbé elkülönülő) 0,48. A II-III. íz medialisán és lateralisán is ívelt, egyenetlen felülettel. Hosszú tapogató szőrök elöl és oldalt ritka eloszlásúak (számuk tíz alatti), a II-III. ízben hosszuk maximum 0,21 (vagyis a tapogatók szélességével egyenlő). A hypostoma kúp alakú, hossza 0,26, szélessége az alapjánál 0,15, hossz/szélesség aránya 1,73. A fogak gyengén kiemelkedőek, a fogképlet 3/3.

A lábak hosszúak: a Haller-szerv megnyúlt, hosszabb az I. tarsus maximális szélességénél (illetve átmérőjénél). A csípők medialisán lekerekítettek, tövis nélküliek, rövid (0,07) szőrökkel.

Nympha (4.1.2.3. ábra.)

Az idiosoma hossza 3,7. A pajzs megnyúlt (hossza 1,04, szélessége 0,67, hosszúság: szélesség indexe 1,55), fordított ötszög alakú (legszélesebb a hosszanti felezőjénél), enyhén konvex, csaknem egyenes caudolateralis széllel. A pajzson anteriolateralisan harántredők húzódnak, a pontozottság elszórt. A cervicalis barázdák közepesen mélyek, a scutum caudolateralis szélét legnagyobb szélessége mögött érik el. Az alloscutum szőrei hosszúak (leginkább hátul: > 0,2). Ventralisan az idiosoma szőrök elöl és a végbélnyílás körül rövidebbek (< 0,1). A légzőnyílások lemezei oválisak.



4.1.2.3. ábra. Az *Ixodes collaris* nympa habitusrajzai: felül- és alulnézet (rajzolta: Murányi Dávid).

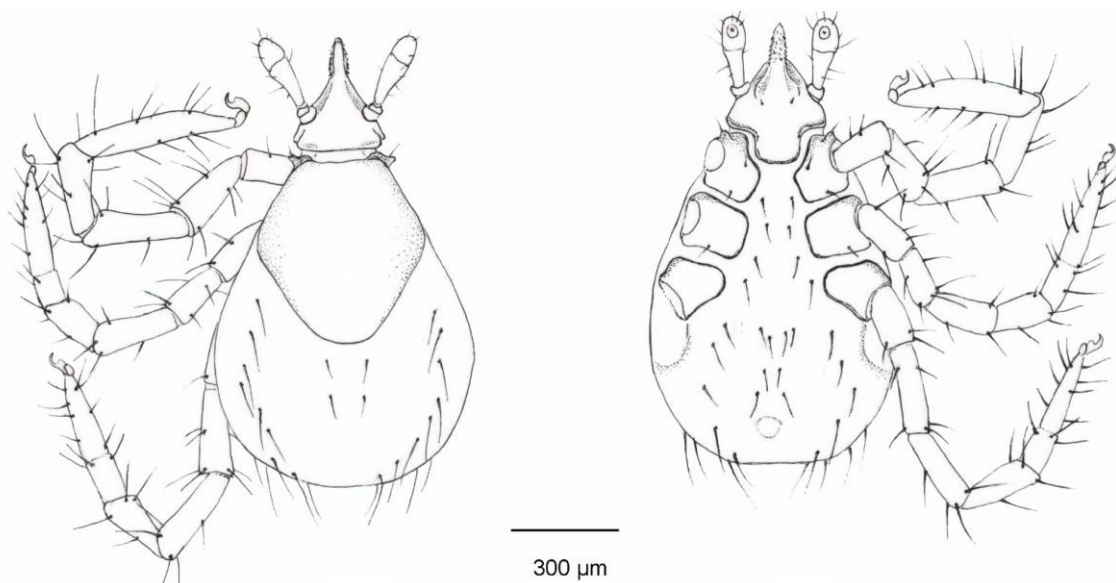
A gnathosoma hossza (a tapogatók csúcsától a fej alapi rész hátsó széléig) 0,65, a fejalap szélessége felül 0,46, hossz: szélesség arány 1,4. A fej alapi rész felülnézetben háromszög alakú, hátul haránt irányú, felemelkedett peremmel, ami oldalt dorsoventralis irányban folytatódik. Ventralisan, a fej alapi rész mindkét oldalán (caudolateralisan) áttetsző, széles perem ("gallér") figyelhető meg, ami az I. csípő elülső része fölé nyúlik. A tapogatók karcsúak, megnyúltak (méret: 0,45): felülről az I., II. és III. íz mérete 0,05, 0,23 illetve 0,17. A hypostoma sérült.

A lábak mérsékelten hosszúak, vékonyak. A csípők tövis nélküliek (de az I. csípő caudomedialisán enyhén kicsúcsosodik), rajtuk néhány hosszabb és rövidebb (< 0,02) szőr található. Az I. tarsus 0,75 hosszú.

Lárva (4.1.2.4. ábra.)

Az idiosoma hossza 0,96, szélessége 0,76, hossz/szélesség aránya 1,26. A scutum ötszögletű, hátul lekerekített, legszélesebb kevéssel hosszának felezője előtt (4.1.2.4. ábra). A scutum durva felületű, hossza 0,52, szélessége 0,49, hossz/szélesség aránya 1,06. A cervicalis barázdák hosszúak, ott végződnek, ahol a scutum posterolateralis peremének konkáv görbülete a legmélyebb. A scutum nem szőrözött. Az alloscutum szőrei hátul a leghosszabbak; a centralis dorsalis szőrök (Cd1: 0,045, Cd2: 0,047) rövidebbek, mint a marginalis dorsalis szőrök (Md1-Md8: 0,088, 0,096, 0,105, 0,112, 0,125, 0,108, 0,133 és 0,148). Ventralisan, a sternalis szőrök (St1: 0,056, St2: 0,051; St3: 0,062) rövidebbek, mint a premarginalis szőrök (Pm1-Pm4: 0,072, 0,075, 0,076 és 0,071), preanalis szőrök (Pa1: 0,064, Pa2: 0,078); leghosszabbak a marginalis ventralis szőrök (Mv1: 0,092, Mv2: 0,118, Mv3: 0,128) (4.1.2.4. ábra).

Gnathosoma: hossza (a tapogatók csúcsától az alap hátsó széléig) 0,34, az alap szélessége felül 0,25, hossz/szélesség aránya 1,36. A fej alapi rész dorsalisan háromszög alakú, egyenes hátsó széllel. Ventralisan a fej alapi részen két pár rövid (0,015) posthypostomalis szőr. A ventralis basis caudolateralis széle erősen konkáv, a legmélyebb ponton merőleges "beszögeléssel" és sötét, sclerotizált peremmel ("gallér") a fej alapi rész legszélesebb részénél és attól hátrafelé (4.1.2.4. ábra). A ventralis basis hátsó széle lekerekített. A tapogatók megnyúltak, elől kiszélesedőek, medialisan és lateralisan is ívelték (4.1.2.4. ábra). A tapogatók hossza (felülnézetben) 0,24, szélességük 0,07, hossz/szélesség arányuk 3,54. Az első tapogató íz 0,03, a II. 0,13, a III. 0,08. A tapogatószőrök a II-III. íz találkozásánál a leghosszabbak (0,06). A hypostoma kúp alakú, rövid (0,11), a fogképlet 2/2.



4.1.2.4. ábra. Az *Ixodes collaris* lárva habitusrajzai: felül- és alulnézet (rajzolta: Murányi Dávid).

A lábak hosszúak: a Haller-szerv megnyúlt, hosszabb az I. tarsus (0,48) maximális szélességénél (átmérőjénél). A csípők medialisan lekerekítettek, tövis nélküliek. Az I-II. csípő medialis szélei egyenesek, csaknem egyenlő hosszúságúak, míg a III. csípő esetében lekerekítettek. Az I-II. csípők rövid (0,04) kettő, illetve egy szőrrel (4.1.2.4. ábra).

Differenciáldiagnózis (nőstény, nympa)

Az *I. collaris* és a hozzá leginkább hasonló faj, az *I. vespertilionis* nőstényeinek főbb morfológiai különbségei a következők. Az *I. vespertilionis* pajzsa hátrafelé vékonyodó, és alak indexe meghaladja az 1,6-ot (Arthur, 1956; Feider, 1956; Hornok, 2017a). Ezzel szemben az *I. collaris* pajzsa hátul széles, alak indexe pedig 1,5 körüli. Az *I. collaris* ventralis szőrei rövidebbek az ivarnyílás előtt, mint mögött, míg az *I. vespertilionis* szőrei hasonló hosszúságúak az ivarnyílás előtt és mögött. Az *I. vespertilionis* nőstényének area porosái szélesebbek a hosszuknál, a köztük lévő sáv keskeny (Arthur, 1956; Feider, 1956; Hornok, 2017a), és előrefelé összetérő peremszegélyük van. Ezzel szemben, az *I. collaris* nőstényeinek area porosa felületei hosszabbak a szélességüknél, a köztük lévő sáv széles, és peremszegélyük előrefelé előbb széttérő, s csak azután összetérő. Az *I. vespertilionis* nőstényének fej alapi része hátul haránt irányú, felemelkedett peremmel rendelkezik, ami oldalt függőleges irányban (mint kifelé irányuló karima) folytatódik, a hypostoma tengelyére merőlegesen (Arthur, 1956). Ezen felül, az *I. collaris* basis capituli ventralis részén, egy széles, gallérszerű szegély húzódik a tapogatók tövétől hátrafelé (caudolateralisan, csaknem vízszintes-hosszanti helyzetben). Továbbá, az *I. vespertilionis* csípőin hátul és kifelé néhány hosszú (100 µm vagy afeletti) szőr található (Feider, 1965; Hornok, 2017a), míg az *I. collaris* csípőfelületein főként rövid szőrök vannak. A Haller-féle szerv elülső gödrének érzéksértéi az *I. collaris* esetében csoportos elrendezést mutatnak, míg az *I. vespertilionis* fajnál sorban találhatóak (Hornok és mtsai, 2015a). Az *I. collaris* nympáját az *I. vespertilionis* fajétól a kétoldali "gallér" jelenléte különbözteti meg.

Az *I. collaris* nősténye különbözik az *I. ariadnae* fajétól is: a pajzs alakjában (elől keskeny vs. elől széles), az area porosa alakjában (hosszabb, mint széles vs. szélesebb, mint amilyen hosszú), a tapogatók alakjában (megnyúlt vs. széles), a "gallér" szempontjából (megvan vs. hiányzik), a csípőszőrök elrendezésében és hosszában (rövidebb vs. hosszabb szőrök jellemzőek) (Hornok és mtsai, 2015a). Másfelől, a két faj között hasonlóságok is vannak, így a Haller-féle szerv elülső gödrének érzékszőreinek elrendezése (ami nem lineáris, hanem csoportos), továbbá a nympa pajzsának egyenetlen (ráncolt) felülete (Hornok és mtsai, 2015a). Az *I. collaris* nőstényével szemben az *I. simplex* fajé elől széles pajzssal, rövid és széles tapogatókkal, rövid lábakkal és a IV. csípőn sok hosszú szőrrel jellemezhető (Hornok és mtsai, 2015a).

Differenciáldiagnózis (hím, lárva)

Felfedezése előtt az *I. collaris* példányait valószínűleg az *I. vespertilionis* fajjal tévesztették össze Délkelet-Ázsiában (például: Wilson, 1970). Ezért a differenciáldiagnózis ez utóbbi fajra összpontosít, ahogy újra jellemezték (Arthur, 1956; Feider, 1965). Ez utóbbi forrás mellett, ahonnan az *I. simplex* lárva adatai származnak, az *I. simplex* hímjének újbóli leírását is figyelembe vettük (Sándor és mtsai, 2018), csakúgy, mint a méreteket az *I. ariadnae* fajra vonatkozóan (4.1.1. fejezet).

Az *I. collaris* hímjének hosszú lába van, szemben az *I. simplex* hímjével. Az *I. collaris* hím tapogatói konvex, ívelt szélűek lateralisán és medialisán egyaránt, szemben az *I. ariadnae* hímjével (amelynek tapogatói oldalt egyenesek) és az *I. simplex* hímjével (amelynek tapogatói oldalt tompaszögben megtörtek). A tapogató szőrei hosszúak ($\leq 210 \mu\text{m}$), szemben az *I. ariadnae* (30-100 μm) és az *I. simplex* (20-80 μm) hímjeivel. A legfontosabb jellemzők, amelyek megkülönböztetik az *I. collaris* és az *I. vespertilionis* hímeket a gnathosomával kapcsolatosak: (A) hosszúkásabb tapogatók (hossz/szélesség arány 2,52) az *I. vespertilionis* fajhoz képest (hossz/szélesség arány 2-2,1); (B) a ritkább eloszlású és kisebb számú (< 10) elülső és oldalsó tapogatószőrök, amelyek sűrűbben helyezkednek el és több van belőlük az *I. vespertilionis* hím (>20) esetében; és (C) a fej alapi részén felül található hátrafelé kiszélesedő (trapezoid) perem (sclerotisatio), amely az *I. vespertilionis* hímjén kevésbé feltűnő és hátrafelé összetérő (U-alakú) képlet. Ezen felül (D) az *I. collaris* hím idiosomája hosszúkásabb az *I. vespertilionis* hímjéhez képest (hossz/szélesség arány 1,61 vs. 1,35) és (E) a végbélnyílás előtti világos terület ovális, megnyúlt az *I. collaris*, míg kevésbé elkülönülő az *I. vespertilionis* esetében.

Az *I. collaris* lárva lábai hosszúak, az *I. simplex* lárvával ellentétben. Az *I. collaris* lárva tapogatói megnyúltak, kiszélesedő végűek, hossz/szélesség arányuk meghaladja a hármast (hossz \times szélesség 240 \times 70 μm), szemben a többi denevérkullancs-faj lárvával: *I. vespertilionis* (szintén kiszélesedő végűek, de rövidebbek: 200 \times 70 μm), *I. ariadnae* (rövidebb és szélesebb: 200 \times 90 μm , oldalt egyenes) és *I. simplex* (rövidebb és keskenyebb: 140 \times 60 μm). Az *I. collaris* lárva pajzsa hosszabb a szélességénél, ötszögletű, hosszú nyaki barázdákkal, amelyek ott végződnek, ahol a scutum posterolateralis peremének konkáv görbülete a legmélyebb (ellentétben az *I. ariadnae* és az *I. simplex* lárváival). A legfontosabb jellemzők, amelyek megkülönböztetik az *I. collaris* és az *I. vespertilionis* hímeket a fej alapi részen alul láthatóak: (A) az *I. collaris* lárván ennek caudolateralis szélé erősen konkáv, a legmélyebb ponton merőleges "beszögeléssel", míg ez a rész az *I. vespertilionis* lárva esetében enyhén konkáv, tompaszögű; és (B) és az *I. collaris* lárva fej alapi részén alul oldalt-hátrafelé feltűnő, hosszú, sötét, sclerotizált perem ("gallér") található, amely az *I. vespertilionis* lárván sokkal kevésbé feltűnő. Ezenkívül (C) az *I. collaris* lárván az idiosoma caudalis szőrei jelentősen meghaladják a 100 μm -t, de az *I. vespertilionis* lárván rövidebbek ($\leq 100 \mu\text{m}$); és (D) az *I. vespertilionis* lárva I. csípőjének medialis szélé jóval rövidebb, mint a II. csípőé, szemben az *I. collaris* lárvával.

Gén szekvenciák (molekuláris módszerek: A, B)

A #2 paratípus mitochondrialis citokrom-c oxidáz I-es alegység (*cox1*) génjének génbanki szekvenciája KR902756, a 16S rRNS gén szekvenciája pedig KR902771.

Gazdafajok és földrajzi elterjedtség

A holotípus esetében *Hipposideros pomona* (Hippodamiidae), *Rhinolophus affinis* (Rhinolophidae). Ismert előfordulása Vietnám.

Etimológia

Az új faj neve a fej alapi részén alul, caudolateralisan látható széles, gallérszerű peremre utal.

Nevezéktani háttér

A Zoológiai Nomenklatura Nemzetközi Kódjának (ICZN) 8.5-ös szekciója szerint az új fajt és nevének részleteit a ZooBank a következő élettudományi azonosító (LSID) alatt benyújtott adatok tartalmazzák: zoobank.org:pub: 69505966-6D7B-4190-AC05-478555A34C5D és zoobank.org:act:4F3017E9-93D1-4C0B-ACF3-26CB11AC8928.

Megbeszélés

Az Európában és Ázsiában gyűjtött denevércsípőcsok (*Ixodes* spp.) szekvencia különbségei korábbi vizsgálatunk szerint meghaladják a fajon belüli genetikai különbözőség határait (Lv és mtsai, 2014; 4.8.1. fejezet). Ezzel összhangban, az *I. collaris* fent összefoglalt morfológiai bélyegei egyértelműen alátámasztják önálló faji státuszát. Érdekes, hogy míg az *I. collaris* példányait Délkelet-Ázsia számos részén valószínűleg *I. vespertilionis* fajúnak vélhették, a *cox1* és *16S rRNS* gének vizsgálata alapján az új faj közelebbi filogenetikai rokonságban áll az *I. ariadnae*, mint az *I. vespertilionis* fajjal (4.8.1. fejezet).

A denevércsípőcsok földrajzi elkülönültsége fontos előmozdítója lehet csípőcsok fajképződésének (speciációjának). Ennek megfelelően, a kis patkósdenevérek (*R. hipposideros*) földrajzi izolációja a Pireneusoktól északra illetve délre csípőcsok (*I. vespertilionis*) nagyfokú genetikai diverzitását vonta maga után, ahogy erről beszámoltunk (4.8.1. fejezet). Az *I. vespertilionis* már ismert fő gazdafaja (*R. hipposideros*), és az *I. collaris* fajé (ahogy itt közöltük: *R. affinis*, *H. pomona*) Eurázsiai allopatrikus földrajzi elterjedésük, tehát míg az előbbi a Himalájától nyugatra fordul elő, addig az utóbbi két denevérfaj a Himalájában és attól keletre. Ez (és minden bizonnyal a niche elkülönülés egyéb tényezői is) szelekciós nyomásként hathattak e denevérfajok evolúciós elkülönülésekor (amit filogenetikai csoportosulásuk is jelez: 4.8.1. fejezet; Li és mtsai, 2007) éppúgy, mint csípőcsok esetében, tehát az *I. vespertilionis* és az *I. collaris* fajok eltérő irányú fejlődésekor.

Az *I. vespertilionis* fajt mindig is ritkának tartották Délkelet-Ázsiában (Petney és Keirans, 1994), ami részben megmagyarázza, hogy miért nem vizsgálták e csípőcsokfajt összehasonlító morfológiai szempontból részletesen ebben a térségben. Az *I. vespertilionis* leírása Japánból (Yamaguti és mtsai, 1971) azt tükrözi, hogy számos vonásában osztozik az *I. collaris* új fajjal, így például a pajzs alakjában, a gnathosoma ventrális gallérszerű peremében és a Haller-féle szerv elülső gödrének érzékszervi csoportosulása szempontjából. Ezért, főként ha még figyelembe vesszük a vietnámi és a Japánból származó denevércsípőcsok filogenetikai viszonyait (4.8.1. fejezet), lehetséges, hogy az *I. collaris* Japánban is előfordul. Ráadásul, mivel a *R. affinis* az új csípőcsokfaj fontos gazdájának tűnik (amint erre itt rámutattunk), és e denevérfajt az *I. vespertilionis* fő gazdjaként írták le Dél-Kínában (Bush és Robbins, 2012), feltételezzük, hogy az *I. collaris* széles körben elterjedt Délkelet-Ázsiában.

Következésképpen, első alkalommal írtam le egy vietnámi denevércsípőcsok-faj összes stádiumát. Mivel az *I. vespertilionis* és e csípőcsok között lényeges genetikai és morfológiai különbségeket találtunk, ezek alapján az utóbbiak külön, új fajba tartoznak, amelynek az *I. collaris* Hornok, 2016 nevet adtuk.

4.2. Csípőcsok és egy óvantag közvetítette kórokozó új rendszertani viszonyai

4.2.1. Madarak csípőcsokainak (*Ixodes*, *Hyalomma* és *Haemaphysalis* spp.) filogenetikai vizsgálata

Előzmények

A madarak fontos szerepet játszanak a csípőcsok és csípőcsok közvetítette kórokozók rövid- és hosszú távú terjesztésében. Közép-Európában, így Magyarországon is a vonuló madarak egzotikus csípőcsokfajokat hozhatnak magukkal a mediterrán térségből vagy akár távolabbról (4.7.9. fejezet). Szintén ismert, hogy a madarak fontos gazdái a régió helyi (honos) csípőcsokfajainak (4.5.1. fejezet). Ezeknek a korábbi tanulmányoknak az eredményeit kívántuk nagyobb mintaszámmal kiegészíteni és a gyűjtött csípőcsokokat szélesebb körben (genetikailag is) összehasonlítani. Jelen vizsgálatunk célja tehát az volt, hogy átfogó képet nyújtsunk a közép-európai énekesmadarakat – részben vonulási időszakukban – fertőző csípőcsokfajok faji és genetikai diverzitásáról, majd az így kapott adatokat földrajzi és ökológiai összefüggésben értelmezzük.

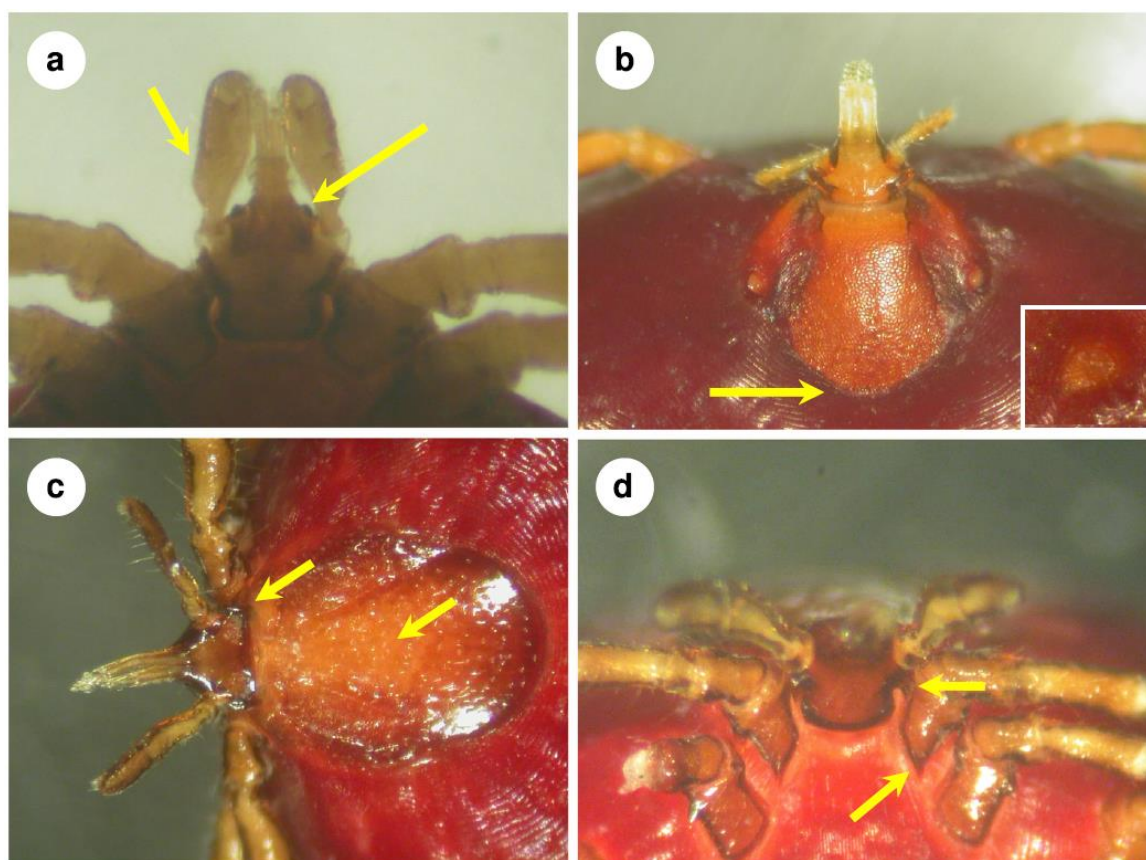
Molekuláris módszerek: A, B

Madarak kullancsfertőzöttsége kullancs- és madárfajok szerint:

A 2012-2014 közötti időszakban összesen 3339 kullancsot gyűjtöttünk 1167 énekesmadárról, amelyek 47 fajba tartoztak. A két leggyakoribb kullancsfajnak az *Ixodes ricinus* és a *Haemaphysalis concinna* bizonyult, 2296 (68,8%, CI: 67,2–70,3%) illetve 989 (29,6%, CI: 28,1–31,2%) példánnyal, amelyek kizárólag lárvák és nymphák voltak. A madarakon az *I. ricinus* jelenlétét március és november között figyeltük meg, míg ez a *Ha. concinna* esetében március és október közé esett.

A vizsgálati periódusban 48 *I. frontalis* mintát (köztük három adultot) is sikerült gyűjtenünk, többségében (79,2%, CI: 65–89,5%) vörösbegyőről (*Erithacus rubecula*) (2. táblázat). Ez a kullancsfaj minden évszakban előfordult (augusztustól novemberig és januártól áprilisig), a legnagyobb számban tavasszal (4.2.1.3. táblázat).

Az egzotikus (termofil és hazánkban nem honos) kullancsfajok közül három *Hyalomma* nympa került elő mezei posztátáról (*Sylvia communis*) 2014 májusában, amelyek a *Hy. rufipes* fajra emlékeztettek a légzőnyílások lemeze és a pajzs alapján (4.2.1.1.b ábra).



4.2.1.1. ábra. A hazánkban adott fejlődési stádiumban először azonosított kullancsfajok. (a) *Ixodes frontalis* nympa (nyilak: közel párhuzamos tapogató élek, "homlokdudor"); (b) *Hyalomma rufipes* nympa (nyíl: scutum hátul lekerekített, kis kép: hosszúkas légzőnyílás); (c) *I. festai* nőstény felülnézete (nyilak: scutum pontozottság, cornua); (d) *I. festai* nőstény alulnézete (nyilak: auriculae, belső csípőtővis).

Ezenfelül, két morfológiai alapon *I. festai* fajúként azonosított nőstényt (4.2.1.1.c és d ábra) találtunk zöldikén (*Carduelis chloris*) és erdei szürkebegyen (*Prunella modularis*) 2014 márciusában. Egy *I. lividus* nőstényt is eltávolítottunk partifecskéről (*Riparia riparia*) 2014 júliusában.

A felmérés legfontosabb kullancsfertőzött madárfajait összehasonlítva megállapítható, hogy az *I. ricinus* és az *I. frontalis* lárvák és nymphák többsége (1546 a 2239-ből: 69,1%, CI: 67,1-71% illetve 44 a 48-ból: 91,7%, CI: 80-97,7%) jellemzően földről táplálkozó madárfajokon fordult elő, míg a *Ha.*

concinna fejlődési alakjainak 73,9%-a (712 a 964-ből, CI: 71-76,6%) magasabban (a föld felett) táplálkozó madarakon, ami erősen szignifikáns összefüggés volt (Fisher-egzakt teszt: $P < 0,0001$). Másfelől, a kullancsfertőzöttség intenzitása (4.2.1.2. táblázat) nem mutatott szignifikáns különbséget a madarak testsúly (kisebb: 6-30 g, nagyobb: 31-140 g) és vonulási távolság (rezidens, illetve rövid vagy hosszú távú vonulók) szerint megkülönböztetett kategóriái között (Mann-Whitney U-Teszt: $P > 0,05$).

4.2.1.1. táblázat. A vizsgálatban használt kullancsfajok haplotípusai és szekvenciáik génbanki számai.

Kullancsfaj	Hozzáférsi szám:	
	cox1 gén (haplotípusok)	16S rRNS gén (haplotípusok)
<i>Ixodes frontalis</i>	KU170492-500 (A-Hu1 - A-Hu9)	KU170518 (A-Hu16S)
	KU170501-9 (B-Hu1 - B-Hu9)	KU170519 (B-Hu16S)
<i>Ixodes festai</i>	-	KU170521-2 (Hu165, Hu166)
<i>Ixodes lividus</i>	KU170510	KU170520
<i>Hyalomma rufipes</i>	KU170491	KU170517
<i>Haemaphysalis concinna</i>	KU170511-6 (Hu1 - Hu6)	KU170523-5 (Hu167 - Hu169)

A madarak kullancsainak molekuláris taxonómiai vizsgálata földrajzi összefüggésben:

(a) *Ixodes frontalis*

A 46 molekulárisan elemzett *I. frontalis* példány között, amelyek cox1 gén szakaszát szekvenáltuk, egyértelműen két genetikai vonal különült el, mindkettő kilenc haplotípussal ("A": KU170492-500, és "B": KU170501-9). E két genetikai vonal elkülönülése a törzsfán magas (100%) támogatottságú volt (4.2.1.2. ábra). Az egyes haplotípusok között 1-2 bp különbség volt az "A" vonalon, és 1-4 bp különbség a "B" vonalon, de akár 56 nukleotid eltérést (598/654 bp, vagyis mindössze 91,4% azonosságot) is mutattak a két genetikai vonal között. Az ezt követő 16S rRNS gén analízis (amelyben minden különböző cox1 haplotípus részt vett) csak két eltérő genetikai változatot tárt fel (KU170518: A-Hu16S és KU170519: B-Hu16S haplotípusok), amelyek 4 bp-ban különböztek, vagyis 99%-ban (402/406 bp) azonosak voltak. E két 16S rRNS haplotípus szekvenciái 100%-ban egyeztek délnyugat-európai izolátumokkal (KP769863 és KP769862, az Azori-szigetekről). A 16S rRNS gén filogenetikai elemzése megerősítette a két *I. frontalis* genetikai vonal elkülönülését (4.2.1.3. ábra). Az *I. frontalis* haplotípusok forrásait a 4.2.1.3. táblázat foglalja össze.

(b) *Ixodes festai*

Az *I. festai* esetében a cox1 szekvenálás nem sikerült. A két minta 16S rRNS génszakaszában (KU170521-2) 3 nukleotidban különbözött (373/376 bp, tehát 99,2% azonosság), de ezek a törzsfán együtt csoportosultak (4.2.1.3. ábra).

(c) *Ixodes lividus*

A vizsgálatunkban kapott *I. lividus* cox1 szekvencia (KU170510) 100%-ban azonos volt e kullancsfaj angliai mintájának szekvenciájával (GU124743), a hazai 16S rRNS szekvencia pedig (KU170520) 99,7% (398/399 bp) azonosságot mutatott egy másik mintával nyugat-Európából, Belgiumból (KJ414461).

(d) *Hyalomma rufipes*

A *Hyalomma* nympa cox1 szekvenciája (KU170491) a legnagyobb mértékben (645/649 bp, tehát 99,4%) egy etiópai *Hy. rufipes* × *Hy. dromedarii* hybrid génbanki szekvenciájával volt azonos, míg csak 99,2%-ban (644/649 bp) egy *Hy. marginatum* szekvenciával (AJ437091). E minta 16S rRNS génje alapján (KU170517) is a legnagyobb hasonlóságot a *Hy. rufipes* fajjal (L34307) mutatta (405/406 bp, tehát 99,8% azonosság), és kisebb mértékűt (403/407 bp: 99%) a *Hy. marginatum* fajjal (KP776645).

MADÁRFAJOK TULAJDONSÁGAI					Kullancsok száma összesen							
					t/n	<i>I. ricinus</i>		<i>H. concinna</i>		<i>I. fr.</i>	<i>I. fe.</i>	<i>H. r.</i>
faj rövidítve	jellemző táplálk.	vonulási távolság	súly (g)	n	L	N	L	N	L/N/F	F	N	
ACR PAL			10-17	53	2.1	39	41	18	14	-	-	-
ACR SCH			10-13	30	2.6	3	10	10	56	-	-	-
ACR SCI		hosszú	9-12	70	1.8	29	45	18	36	-	-	-
LOC LUS			14-17	92	4.9	1	7	206	236	-	-	-
LOC NAE			13-16	2	11	-	-	18	4	-	-	-
SYL COM	FÖLD FELETT		13-20	12	1.1	5	8	-	-	-	-	3
PHY COL		közép	6-11	8	1.4	5	6	-	-	-	-	-
SYL ATR			16-25	69	1.7	45	39	7	22	-/1/-	-	-
CAR CHL			25-35	30	1.7	1	47	-	1	-/-/1	1	-
COC COC		rövid	46-80	11	2.4	-	25	1	1	-	-	-
PRU MOD			16-25	67	3.1	24	173	3	4	-	1	-
EMB CIT			27-30	2	20	-	-	38	2	-	-	-
EMB SCH		helyi	27-30	2	8.5	3	-	2	12	-	-	-
PAR MAJ			16-22	81	1.8	49	88	2	1	1/-/1	-	-
LUS LUS			24-38	10	4.2	40	2	-	-	-	-	-
LUS MEG	FÖLDRŐL	hosszú	17-28	24	4	61	17	18	1	-	-	-
TUR ILI			55-75	3	6.5	2	12	-	-	-	-	-
ERI RUB			16-22	318	2.3	469	195	27	5	22/15/1	-	-
TRO TRO		rövid	7-12	13	1.8	15	8	-	-	-	-	-
TUR MER			80-140	149	4.6	137	421	47	73	-	-	-
TUR PHI			65-95	56	4.5	49	118	31	50	5/1/-	-	-

4.2.1.2. táblázat. A legfontosabb madárfajok tulajdonságai és összesített kullancsfertőzöttsége. Itt azon madárfajok szerepelnek, amelyekből legalább nyolc fertőzött egyed volt, vagy rajta a vizsgálati periódusban (2012 márciustól 2014 novemberig) több, mint 10 kullancsot találtunk. A vastag számok a nagyobb súlykategóriát jelölik. Rövidítések: n = kullancsfertőzött egyedek száma; t/n = a kullancs fertőzöttség intenzitása; L = lárva, N = nympa, F = nőstény, l. fr. = *Ixodes frontalis*; l. fe. = *Ixodes festai*; H. r. = *Hyalomma rufipes*. A madárfajok rövidítései a disszertációban elől találhatóak.

(e) *Haemaphysalis concinna*

A molekulárisan vizsgált 12 *Ha. concinna* minta között hat különféle *cox1* haplotípust találtunk (KU170511-6), legfeljebb nyolc nukleotid eltéréssel (ami 622/630, azaz 98,7% azonosságot jelent). A törzsfán e hat *cox1* haplotípus két genetikai vonal mentén csoportosult, magas (100%) támogatottság mellett (4.2.1.2. ábra). E *cox1* haplotípusok három 16S rRNS haplotípust képviseltek (KU170523-5), 1-2 bp különbséggel. A 16S rRNS gén filogenetikai vizsgálat megerősítette a Hu167 genotípus (ami a Hu1-3-at foglalta magában) elkülönülését a többtől (Hu168-9) (4.2.1.3. ábra). Ez utóbbiakat (pl. KU170524) nagymértékű (99,7%, tehát 387/388 bp) azonosság jellemezte a *Ha. concinna* távol-keleti izolátumaival (Japánból: pl. AB819171) és egy továbbival (KP866207: 384/387 bp, 99,2% azonosság) Kelet-Szibériából, amelyekkel a magyar minták együtt csoportosultak a törzsfán (4.2.1.3. ábra). A *Ha. concinna* *cox1* és 16S rRNS haplotípusok forrásait (madárfajok szerint) a 4.2.1.3. táblázat mutatja.

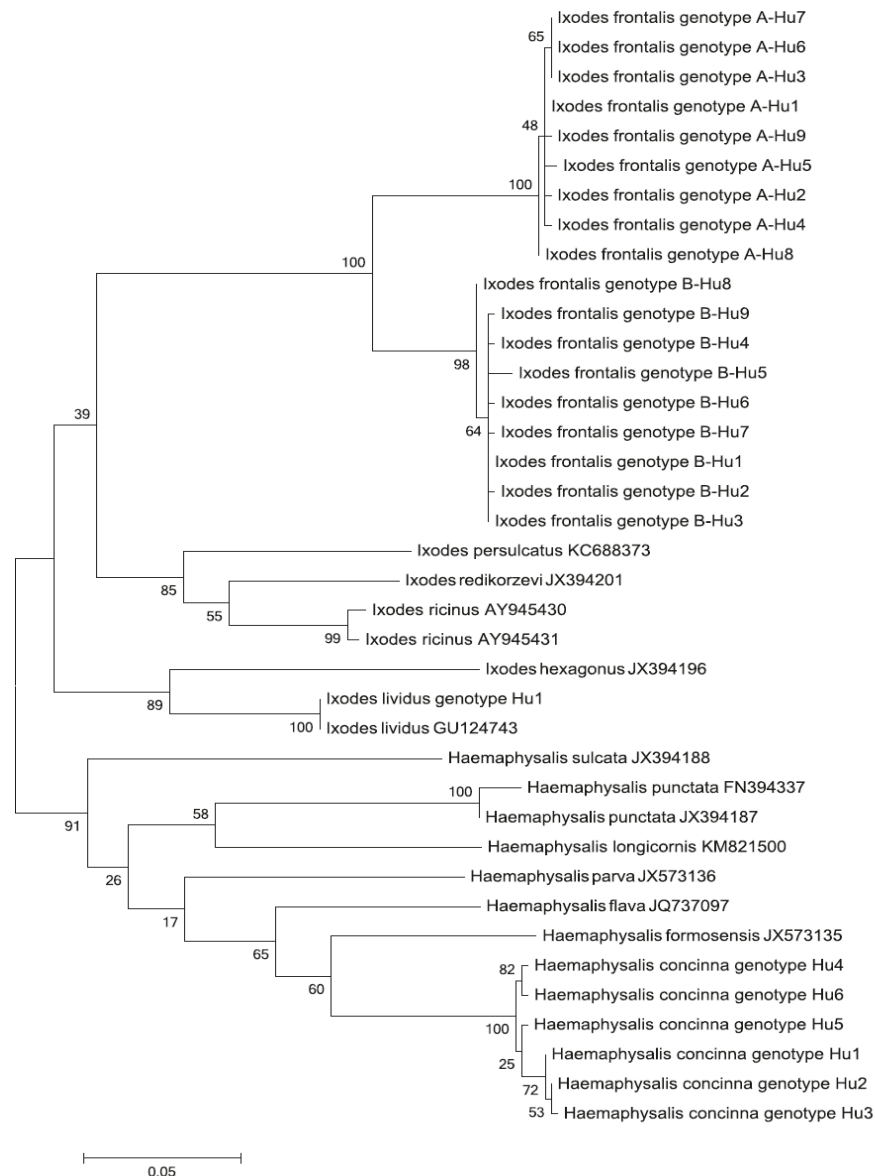
	haplotípus		madárfaj rövidítése										
	cox1	16S rRNS	ERI RUB				TUR PHI	PAR MAJ	SYL ATR	CAR CHL			
<i>I. frontalis</i>	A-Hu1	A-Hu16S	S ¹ S ¹ S ¹ S ² S ² S ² S ⁸ S S S S S A					S ⁵	S				
	A-Hu2		S ²										
	A-Hu3		S										
	A-Hu4		S S										
	A-Hu5		S ⁴ S ⁴										
	A-Hu6		S										
	A-Hu7									W			
	A-Hu8							A ⁷					
	A-Hu9		S ⁸										
	B-Hu1	B-Hu16S	S ¹ S ¹ S S					M					
	B-Hu2		S ¹										
	B-Hu3		S ² S S S						A				
	B-Hu4									S			
	B-Hu5		S										
	B-Hu6							S ⁵					
	B-Hu7		S ⁶ S ⁶ S ⁶ S ⁶										
	B-Hu8							A ⁷ A ⁷					
	B-Hu9		A										
<i>H. concinna</i>	Hc-Hu1	Hu167		M									
	Hc-Hu2							M		M			
	Hc-Hu3							MA		S	M		
	Hc-Hu4							S					
	Hc-Hu5		Hu168	S A					S				
	Hc-Hu6		Hu169	A									

4.2.1.3. táblázat. Az *Ixodes frontalis* és a *Haemaphysalis concinna* haplotípusai madárfajok és évszakok szerint. Az évszak betűjelének száma egy sorban, ugyanazon madárfaj alatt azt jelzi, hogy hány kullancsot találtak rajta az adott haplotípusból. Az azonos felső index (szám) arra utal, hogy a haplotípusok azonos madár egyedről származnak. Rövidítések: S = tavasz, M = nyár, A = ősz, W = tél. A madárfajok rövidítései a disszertációban elől találhatóak.

Megbeszélés

Vizsgálatunk szolgáltatta az első, molekulárisan is megerősített bizonyítékát annak, hogy Közép-Európában a madarak szállíthatják a *Hy. rufipes* éretlen fejlődési alakjait. Ezen kívül, első alkalommal találtuk meg az *I. festai* fajt Magyarországon. Míg az *I. frontalis* fajnak eddig két nőténye került elő hazánkban több, mint fél évszázada (Janisch, 1959), mostani eredményeink tükrében ezt a kullancsfajt a madarak rendszeresen hordozzák a térségben. Érdekes, hogy egy másik ornithofil kullancsfaj, az *I. arboricola* példányait nem sikerült gyűjtenünk, noha kedvelt gazdái, az odúlakó madarak nagy számban szerepeltek felmérésünkben, és e fajt korábban jelentették Magyarországon éppúgy (Babos, 1965), mint a környező országokban (Szlovákia: Novakova és mtsai, 2015; Románia: Mihalca és mtsai, 2012a).

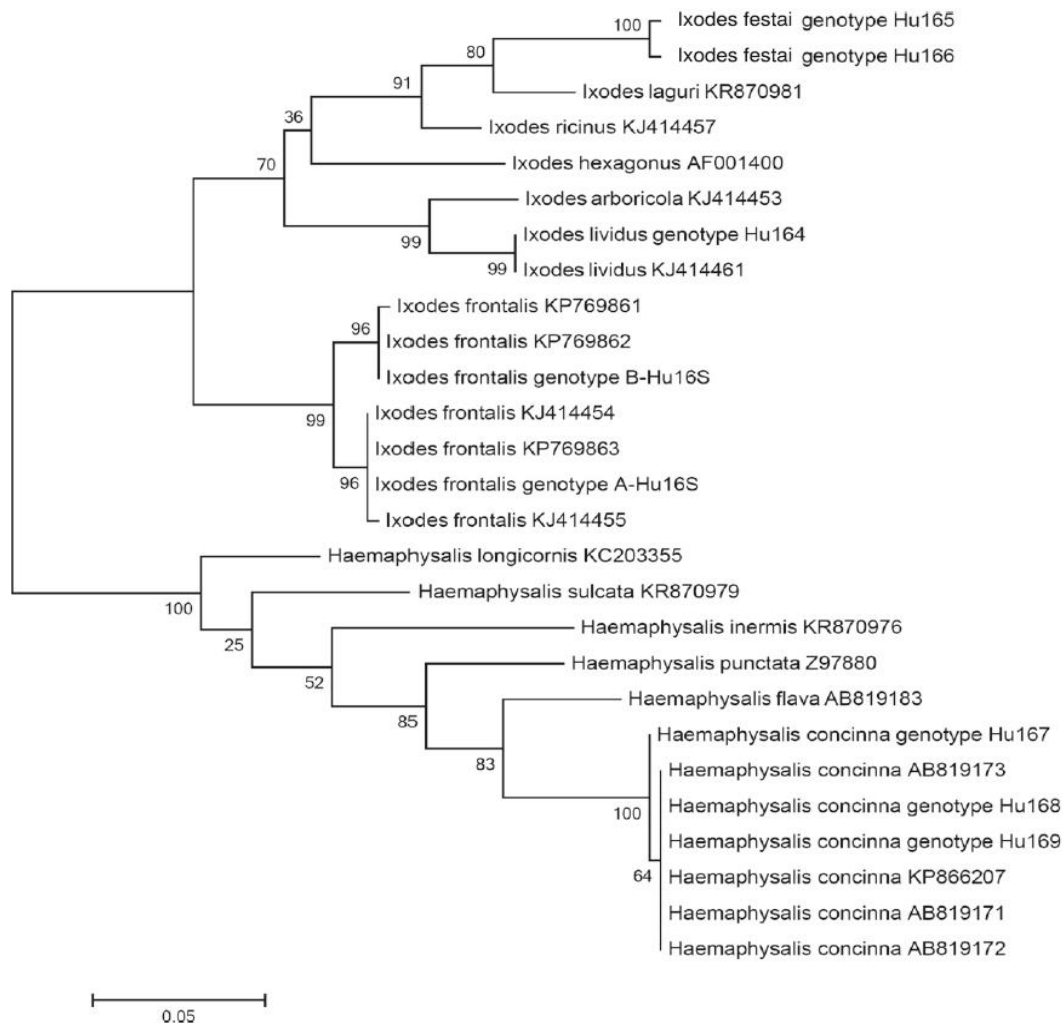
Az *I. ricinus* szezonális jelenléte madarakon megfelelt e kullancsfaj hazánkban leírt gazdakereső aktivitásának (4.3.2. fejezet). Ezzel szemben, a *Ha. concinna* lárvákat és nymphákat a térségre jellemző évszakai előfordulásukhoz képest (Nosek, 1971a) két, illetve egy hónappal hamarabb is megtaláltuk madarakon (tehát már márciustól).



4.2.1.2. ábra. Az *Ixodes*- és a *Haemaphysalis*-fajok *cox1* gén alapján készült törzsfája. A vizsgálatunkhoz tartozó haplotípusokat "Hu" utótag jelöli, a GénBankból lehívottakat hozzáférési számuk.

Az *I. ricinus* és az *I. frontalis* lárvák/nymphák jelenléte szignifikánsan összefüggött a földről táplálkozó madárfajokkal, amit ez utóbbi kullancsfaj esetében elsőként itt mutattunk ki. A *Ha. concinna* fejlődési stádiumai viszont épp ellenkezőleg, szignifikánsan gyakrabban fordultak elő jellemzően magasabban (a föld felett) táplálkozó madárfajokon, ami azzal magyarázható, hogy e kullancsfaj gazdakeresés közben relatíve magasabb helyet foglal el a növényzeten, a lárvák és nymphák hazánkban legkedveltebb gazdafaja, az őz méretével összefüggésben (Hornok és mtsai, 2012b).

Vizsgálatunk során az *I. frontalis* példányok túlnyomó többségét vörösbegyőről gyűjtöttük. E madárfaj leginkább délnyugatról északkelet felé vonul a mediterrán térségből Magyarországra (Hornok és mtsai, 2012c). Ezért adataink értelmében az *I. frontalis* fajt a madarak főként Délnyugat-Európából szállíthatják Közép-Európába. E vonulási kapcsolat megerősítéseként az itt kapott hazai 16S rNS szekvenciák 100%-ban egyeztek az Azori-szigetéről közöltekkel. Továbbá, az *I. frontalis* lárvák és nymphák tavaszi dominanciája hazai madarakon (ahogy itt megfigyeltük) a Portugáliában tapasztalt késő téli szezonális csúcsot követte (Norte és mtsai, 2015).



4.2.1.3. ábra. Az *Ixodes*- és a *Haemaphysalis*-fajok 16S rRNS gén alapján készült törzsfája. A vizsgálatunkhoz tartozó haplotípusokat "Hu" utótag jelöli, a GénBankból lehívottakat hozzáférési számuk.

Két genetikai marker molekuláris és filogenetikai vizsgálata alapján eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy Közép-Európában a madarak az *I. frontalis* kullancsfaj két külön genetikai vonalát hordozzák. E genetikai vonalak elkülönültsége mind a *cox1*, mint a 16S rRNS gén szempontjából magas támogatottságú (4.2.1.2. és 4.2.1.3. ábra). Figyelemreméltó, hogy a két vonal közötti *cox1* szekvencia eltérés (9%) meghaladja a kullancsok faji határaként megjelölt (tehát az azonos fajú kullancsok közötti maximális eltérés) mértékét (a *cox1* gén esetében ez 6.1%: Lv és mtsai, 2014).

Előzőleg az *I. festai* fajt nem azonosították Magyarországon. Jelen vizsgálatunk során zöldikén és erdei szürkebegyen is megtaláltuk. Mindkét madárfaj a mediterrán térségbe vonul telelni, Olaszország irányában (Csörgő és mtsai, 2009), ahol az *I. festai* előfordul (Contini és mtsai, 2011).

Az *I. lividus* specifikus gazdája a partifecske (*Riparia riparia*). A Magyarországon illetve Angliában (Graham és mtsai, 2010) talált példányok szekvencia azonossága arra utal, hogy a Nyugat- és Közép-Európában előforduló populációkban is megtalálható e haplotípus (annak ellenére, hogy hazánk és Anglia között nem ismert a partifecske közvetlen vonulása (Csörgő és mtsai, 2009).

Vizsgálatunkban a *Hyalomma* nymphákat mezei posztátárról távolítottuk el. Ismert, hogy e madárfaj Közép-Európában fészkelő populációi Afrikába, a Szaharától délre vonulnak telelni (Csörgő és mtsai, 2009). Morfológiai alapon mindhárom kullancs azonos fajú volt, és a *Hy. rufipes* fajra hasonlított

leginkább. Az egyik *nympha cox1* szekvenciája egy etióp eredetű *Hy. rufipes* hibrid génbanki szekvenciájához állt legközelebb, amely példányt taxonómiai kulcsok alapján megbízhatóan azonosítottak (Rees és mtsai, 2003). Általában véve, a *Hy. marginatum* fajkomplex lárváit és nympháit a madarak gyakran viszik délről Nyugat- és Közép-Európába (Capek és mtsai, 2014; Jameson és mtsai, 2012). Magát a *Hy. rufipes* fajt madarokról Észak-Európában írták le (Hasle és mtsai, 2009). Európában ezt a kullancsfajt többnyire olyan madarak hordozzák, amelyek a Közel-Kelet térségén repülnek át (ami fontos pihenőhely a fekete-tengeri – mediterrán vonulási útvonalon), mivel az ottani madarakon a *Hy. rufipes* lárvái és nymphái dominálnak (Hoogstraal és Kaiser, 1958; Fain és mtsai, 1995). Ebben az összefüggésben fontos azt is figyelembe venni, hogy a *Hy. rufipes* nymphák képesek adulttá vedleni még Közép-Európa kontinentális éghajlati viszonyai között is, minthogy e kullancsfaj kifejlett egyedeit megtaláltuk hazai szarvasmarhákon (4.6.7. fejezet).

Jelen eredményeink szerint a Közép-Európában énekesmadarak által hordozott *Ha. concinna* lárvák és nymphák 16S rRNS gén szekvenciájukban közel azonosak kelet-szibériai (Khasnatinov és mtsai, 2016) és közel-keleti (Japánból származó) fajtársaikkal (Takano és mtsai, 2014). Jóllehet e nagyfokú genetikai hasonlóság okai sokrétűek, a madárvonulás révén megvalósuló "kullancscsere" Közép-Európa és Kelet-Ázsia között jelentősen hozzájárulhat ehhez. A kelet-atlanti és a fekete-tengeri – mediterrán vonulási útvonalak összekötik Európát és Ázsiát (a mintavételi régióhoz kapcsolódóan pedig ez utóbbi útvonal játszik fontosabb szerepet). Ismert, hogy a Nyugat-Európában telelő és a tavasszal az orosz Távol-Kelet felé vonuló madaraknak közös fészkelőhelyeik lehetnek (Dobrynina és Kharitonov 2006). Vizsgálatunkban a kelet-ázsiaiakhoz nagymértékben hasonló *Ha. concinna* haplotípusokat csak a tavaszi és az őszi vonulás során gyűjtöttünk, mégpedig vörösbegyőről, feketerigóról (*Turdus merula*) és szürkebegyőről (4.2.1.2. táblázat). Ezeknek a madárfajoknak vannak keleti vonulási kapcsolataik, részben Kelet-Európa, részben Ázsia felé (Csörgő és mtsai, 2009; Collar, 2014).

Következtetésképpen, a madarak által Közép-Európában hordozott *I. frontalis* és *Ha. concinna* példányok két genetikai vonalba tartoznak, amelyek nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutatnak azonos fajú, délnyugat-európai illetve kelet-ázsiai kullancsokkal. Az *I. festai* példányait első alkalommal gyűjtöttük Magyarországon. Ezek az eredmények rámutatnak a madarak nyugati és keleti vonulási kapcsolataira fontosságára (ami kiegészíti a déli irány ebből a szempontból már ismert jelentőségét). Ez a lehetőség a kullancs közvetítette kórokozók terjedése kapcsán is figyelmet érdemel.

4.2.2. Ragadozók és denevérek kullancsainak (*Ixodes* spp.) filogenetikai vizsgálata

Előzmények

A *Pholeoixodes* alnemet tagjainak eltérő ökológiai és morfológiai jellemzői alapján emelték (Schulze, 1942). E csoport tagjai rendszerint búvóhelyként üreget használó ragadozókon (Canidae, Mustelidae), rovarévőkön (Erinaceidae) és odú- vagy üreglakó madarakon fordulnak elő. A Nyugat-Palearktikum ide tartozó fontos fajai az *Ixodes canisuga* Johnston, 1849, *I. kaiseri* Arthur, 1957, *I. crenulatus* Koch, 1844, *I. hexagonus* Leach, 1815 and *I. rugicollis* Schulze & Schlottke, 1929. A *Pholeoixodes* alnem tagjaira vonatkozó szakirodalmi adatok gyakran ellentmondásosak (például összetéveszthetőségüket tükrözik a különböző fajnév alatt megjelent azonos szekvenciák: *I. canisuga* [JF928508], *I. hexagonus* [AF001400]). Ilyen esetben a típuspéldányok morfológiai összehasonlítása újonnan gyűjtött példányokkal, majd ez utóbbiak morfológiai és genetikai elemzése tisztázhatja a problémát. Ennek megfelelően, jelen vizsgálatunkhoz kullancsokat gyűjtöttünk kutyákról, rókákról és borzokról Európa kilenc országában, majd ezeket a példányokat morfológiai és filogenetikai szempontból elemeztük.

Molekuláris módszerek: A, B

4.2.2.1. táblázat. A vizsgálatban használt minták adatai és a cox1 szekvencia elemzés eredményei.

Térség	Ország	Gyűjtési hely vagy régió	Gazdafaj	<i>Ixodes</i> -faj (F=nőstények, N=nymphák)	Cox1 haplotípus jelölés (szám ha > 1)	A cox1 szekvenciák génbanki száma
Nyugat-Európa	Egyesült Királyság	Bridgewater	kutya	<i>I. canisuga</i> (2×F)	H, J	KY962048, KY962047
		Glantwymyn	kutya	<i>I. canisuga</i> (2×F)	H (2×)	KY962048
		Plymtree	kutya	<i>I. canisuga</i> (2×F)	H (2×)	KY962048
		Whissonsett	kutya	<i>I. canisuga</i> (2×F)	H (2×)	KY962048
	Franciao.	Bernay	rókalyuk	<i>I. canisuga</i> (F, N)	H (2×)	KY962049
		Nancy	borz	<i>I. canisuga</i> (F, 3×N)	A (2×), F, H	KY962050, KY962051, KY962049
		Nantes	borz	<i>I. canisuga</i> (N)	H	KY962049
		Carquefou	borz	<i>I. canisuga</i> (F, 4×N)	H (5×)	KY962049
Közép-Európa	Németo.	Thuringia	vörös róka	<i>I. kaiseri</i> (4×F)	M (3×), O	KY962042, KY962043
		Thuringia	vörös róka	<i>I. canisuga</i> (6×F)	A (4×), H (2×)	KY962044, KY962045
		Thuringia	vörös róka	<i>I. hexagonus</i> (3×F)	X (3×)	KY962046
	Ausztria	Burgenland	kutya	<i>I. hexagonus</i> (2×N)	X (2×)	KY962019
	Magyaró.	Budapest	kutya	<i>I. kaiseri</i> (8×F)	L (5×), S, P (2×)	KY962011, KY962014, KY962015
Budapest		kutya	<i>I. canisuga</i> (2×F)	A, B	KY962013, KY962012	
Délkelet-Európa	Horvátó.	Jastrebarsko	vörös róka	<i>I. hexagonus</i> (18×F)	U (4×), V (12×), W, Y	KY962036, KY962035, KY962034, KY962041
		Jastrebarsko	vörös róka	<i>I. canisuga</i> (35×F)	A (3×), E, G (23×), I (8×)	KY962040, KY962039, KY962037, KY962038
	Bosznia és Hercegovina	Srebrenik, Zvornik	vörös róka	<i>I. canisuga</i> (10×F)	A (8×), H (2×)	KY962016, KY962017
		Srebrenik, Zvornik	vörös róka	<i>I. hexagonus</i> (2×N)	U (2×)	KY962018
	Szerbia	Svilajnac	vörös róka	<i>I. canisuga</i> (F)	H	KY962030
		Boljevci	vörös róka	<i>I. canisuga</i> (F, N)	A, H	KY962031, KY962030
		Progar	vörös róka	<i>I. canisuga</i> (male)	A	KY962031
		Despotovac	vörös róka	<i>I. kaiseri</i> (N)	N	KY962032
	Románia	Boljevci	vörös róka	<i>I. kaiseri</i> (5×N)	L (5×)	KY962033
			Lazurile	kutya	<i>I. kaiseri</i> (F)	P
		Cefa	vörös róka	<i>I. kaiseri</i> (N)	P	KY962020
		Sălard	vörös róka	<i>I. kaiseri</i> (F)	R	KY962024
		Popesti	vörös róka	<i>I. kaiseri</i> (2×F, N)	P (2×), L	KY962020, KY962026
		Sămpetru	vörös róka	<i>I. kaiseri</i> (4×F, 4×N)	P (2×), L (4×), Q (2×)	KY962020, KY962026, KY962027
		Illia	vörös róka	<i>I. kaiseri</i> (F, N)	L, T	KY962026, KY962028
		Cefa	vörös róka	<i>I. canisuga</i> (2×F, N)	A (2×), D	KY962021, KY962022
		Sătmărel	vörös róka	<i>I. canisuga</i> (2×F)	D, K	KY962022, KY962023
Cusușius		vörös róka	<i>I. canisuga</i> (N)	C	KY962025	
Hodisel		vörös róka	<i>I. canisuga</i> (F)	D	KY962022	
Illia	vörös róka	<i>I. hexagonus</i> (N)	U	KY962029		

4.2.2.2. táblázat. A 16S rRNS haplotípusok származási ország szerint.

Térség	Ország	<i>Ixodes</i> -faj (a 16S rRNS génre vizsgált miták száma)	16S rRNS haplotípusok római számokkal jelölve (szám ha > 1)	A cox1 szekvenciák génbanki száma
Nyugat-Európa	Egyesült Királyság	<i>I. canisuga</i> (2×)	II (2×)	KY962071
	Franciao.	<i>I. canisuga</i> (3×)	I (2×), II	KY962075, KY962074
Közép-Európa	Németo.	<i>I. kaiseri</i> (2×)	IV (2×)	KY962067
		<i>I. canisuga</i> (2×)	I, II	KY962068, KY962069
		<i>I. hexagonus</i> (1×)	VII	KY962070
	Ausztria	<i>I. hexagonus</i> (2×)	VII	KY962058
	Magyaró.	<i>I. kaiseri</i> (3×)	IV, V (2×)	KY962052, KY962054
<i>I. canisuga</i> (2×)		I (2×)	KY962053	
Délkelet-Európa	Horvátó.	<i>I. hexagonus</i> (4×)	VI (3×), VII	KY962076, KY962077
		<i>I. canisuga</i> (3×)	I (2×), III	KY962072, KY962073
	Bosznia és Hercegovina	<i>I. canisuga</i> (2×)	I, II	KY962055, KY962056
		<i>I. hexagonus</i> (1×)	VI	KY962057
	Szerbia	<i>I. canisuga</i> (2×)	I, II	KY962065, KY962064
		<i>I. kaiseri</i> (2×)	IV (2×)	KY962066
	Románia	<i>I. kaiseri</i> (5×)	IV (2×), V (3×)	KY962062, KY962059
		<i>I. canisuga</i> (4×)	I (2×), II [#]	KY962060, KY962061
<i>I. hexagonus</i> (1×)		VI	KY962063	

Eredmények

Összesen 144, a *Pholeioxodes* alnembe tartozó kullancsból vontuk ki a DNS-t. Ezek a következők voltak: 113 (típuspéldányhoz hasonlított) nőstény, 30 nympa, egy hím. Így 84 *I. canisuga*, 34 *I. kaiseri* és 26 *I. hexagonus* DNS mintát vizsgáltunk. Az *I. canisuga* fajúként azonosított kullancsoknak 11 ("A"-tól "K"-ig) *cox1* haplotípusa volt: közülük kettőt hét illetve öt egyed képviselt, a fennmaradó kilencet pedig egyszer találtuk meg. E haplotípusok legfeljebb három nukleotidban különböztek, ami 99,5–100% (628–631/631 bp) szekvencia azonosságnak felel meg. Egyes haplotípusok földrajzi eloszlása egyértelmű mintázatot követett (4.2.2.1. táblázat). Így a "H" haplotípus szignifikánsan gyakrabban fordult elő a nyugat-európai, mint a közép- és délkelet-európai mintákban ($P < 0,0001$). Számos haplotípust csak egyes országokban találtunk meg (például: "B" Magyarországon; "C", "D" és "K" Romániában; "E", "G" és "I" Horvátországban; "F" Franciaországban; "J" az Egyesült Királyságban). Másfelől, az "A" haplotípust Európa minden vizsgált térségében azonosítottuk (4.2.2.1. táblázat).

Az *I. kaiseri* fajúként azonosított kullancsoknak kilenc ("L"-tól "T"-ig) *cox1* haplotípusa volt, amelyeket nagyobb fokú polimorfizmus jellemzett az *I. canisuga* fajhoz képest, mivel akár öt nukleotidban is különböztek (626–631/631 bp = 99,2–100% szekvencia azonosság). E haplotípusok előfordulása Közép- és Délkelet-Európára korlátozódott (4.2.2.1. táblázat). Az "M" és "O" haplotípusok kizárólag Németországban fordultak elő, míg a többi Magyarországon és Délkelet-Európában (4.2.2.1. táblázat).

Az *I. hexagonus* fajúként azonosított kullancsoknak öt ("U"-tól "Y"-ig) *cox1* haplotípusa volt, amelyek legfeljebb három nukleotidban különböztek (628–631/631 bp = 99,5–100% szekvencia azonosság). Az "X" haplotípust csak Németországban és Ausztriában találtuk meg, míg a többi délkelet-európai elterjedésű volt (4.2.2.1. táblázat).

A megvizsgálta *Pholeioxodes* kullancsok 16S rRNS gén szekvenciái kisebb mértékű fajon belüli eltérést mutattak, mint a *cox1* gén (400–402/402 bp = 99,5–100% azonosság), és kevesebb (I–VII.) haplotípusuk volt (4.2.2.2. táblázat). Ezekre a haplotípusokra nem volt jellemző a földrajzi elkülönülés (például az I-es és II-es előfordult Nyugat-, Közép- és Délkelet-Európában is).

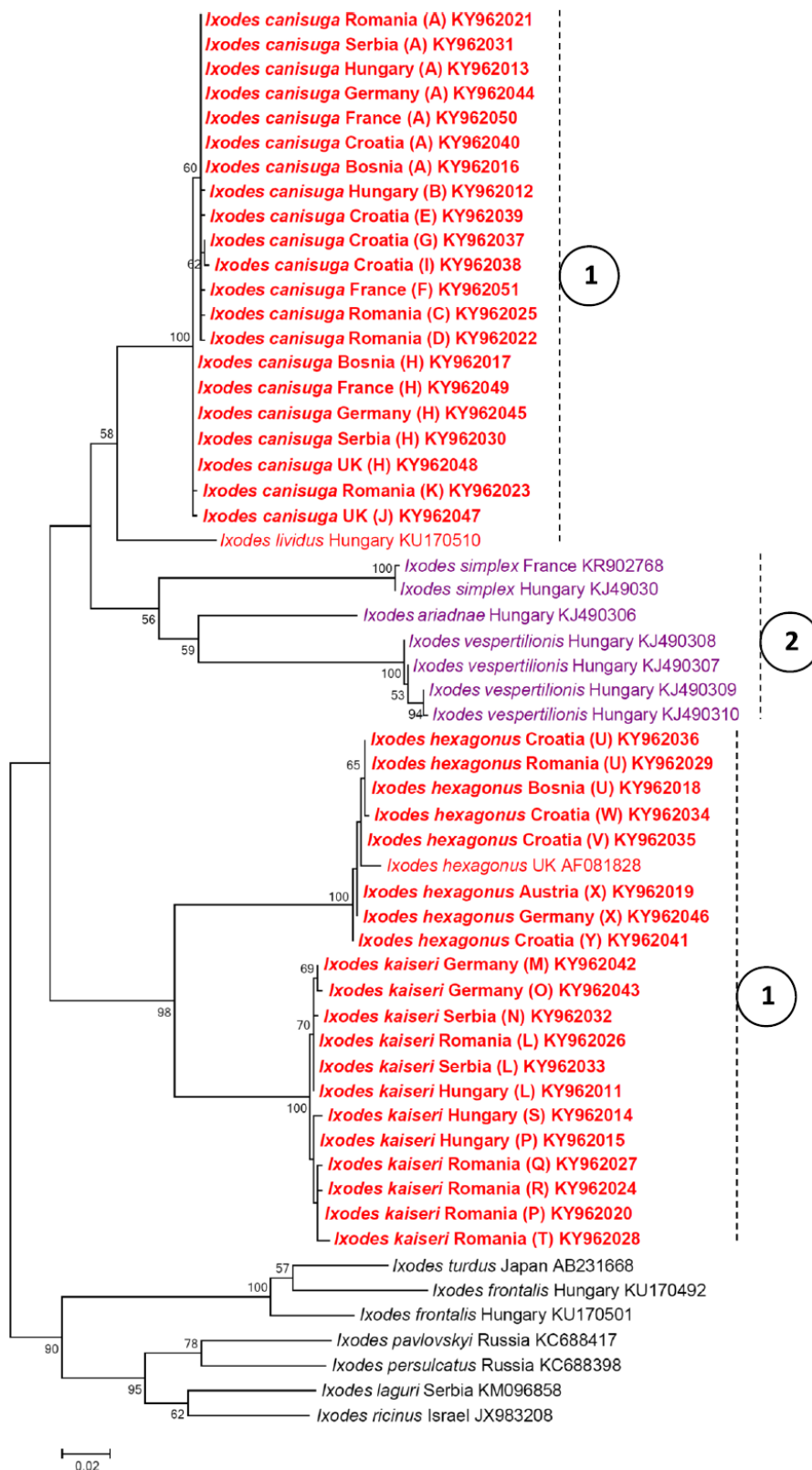
A *cox1* és 16S rRNS haplotípusok filogenetikai viszonyai (4.2.2.1-2. ábra) alátámasztották a három *Pholeioxodes*-faj morfológiai eltéréseit, mivel az utóbbi alapon elkülönített példányok a törzsfán egymás közelébe (egy filogenetikai csoportba) kerültek. Mindkét törzsfá topológiája azt tükrözte, hogy – az elemzett szekvenciák alapján – a *Pholeioxodes* subgenus nem monofiletikus. Az *I. kaiseri* és az *I. hexagonus* mintái testvércsoportot alkottak, míg az *I. canisuga* egyedei közelebbi rokonságban álltak a denevérkullancsokkal (*I. vespertilionis*, *I. ariadnae* és *I. simplex*: subgenus *Eschatocephalus*). Így tehát összességében a *Pholeioxodes*-fajok filogenetikai csoportja magában foglalja a denevérkullancsok kládját (4.2.2.1-2. ábra).

Megbeszélés

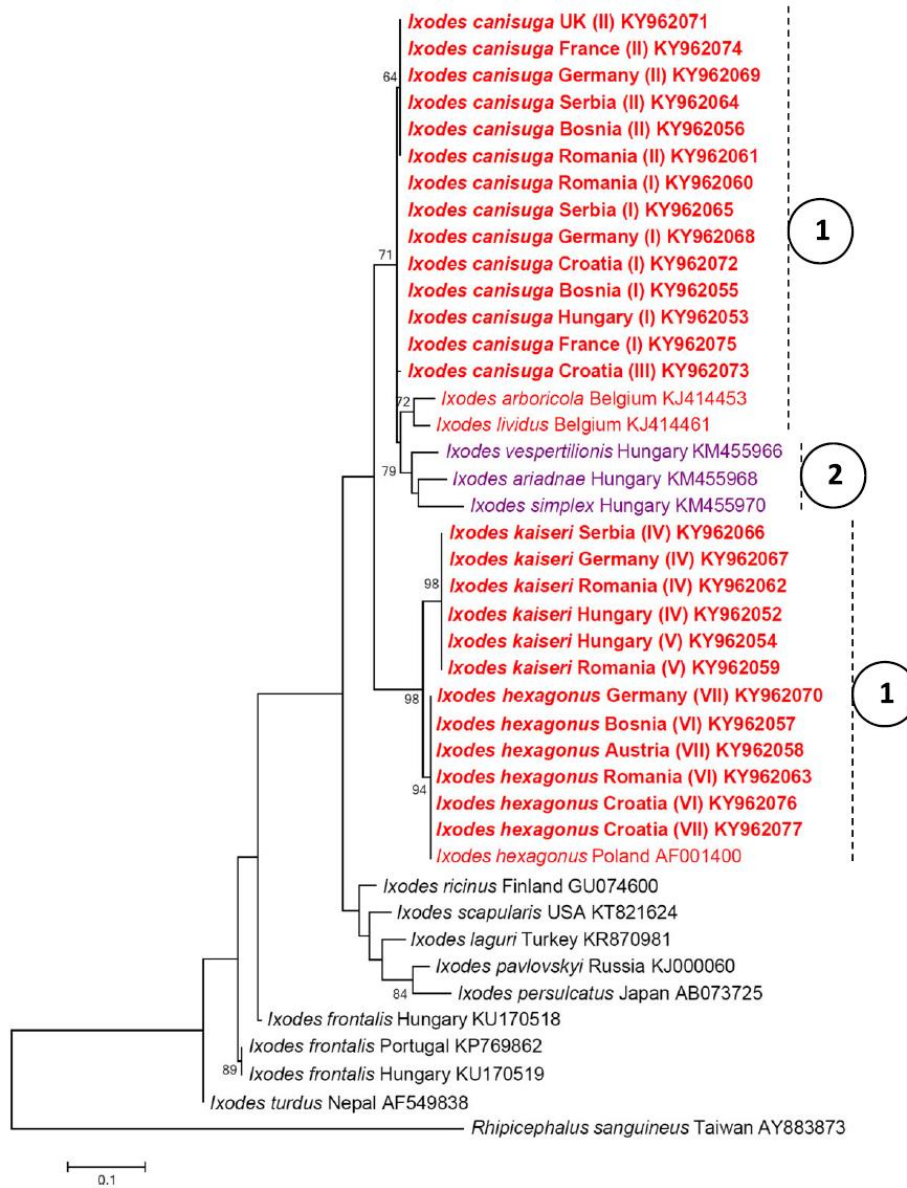
Ez az első átfogó filogenetikai vizsgálat, amely nemcsak a *Pholeioxodes* subgenus három kullancsfajának Európa-szerte gyűjtött egyedeit foglalja magában, de további rokon fajokat is a GénBankból, továbbá a kontinensünkön ismert három denevérkullancs-fajt. Az előbbieket morfológiai alapon megállapított konszpecifitását a molekuláris eredmények megerősítették, ami alátámasztja egyes határozáshoz használt új taxonbélyegek (elsősorban a hypostoma tövével a fejalap felépítésének) fontosságát.

Az itt elvégzett filogenetikai vizsgálatok szerint a *Pholeioxodes* subgenus nem monofiletikus. Figyelembe véve, hogy mind a *cox1*, mind a 16S rRNS szekvenciákra épülő törzsfán az *I. canisuga* és az *I. lividus* egy kládot alkotott az *Eschatocephalus* subgenusba tartozó denevérkullancsokkal, meg kell fontolni ez utóbbiak *Pholeioxodes* alnembe olvasztását. Alternatív megoldás lehet, ha a *Pholeioxodes* alnemet kettéosztják. Mindazonáltal ezek az eredmények megerősítik a morfológiai bélyegek filogenetikai relevanciáját, mivel a szóban forgó denevérkullancs fajoknak – a legtöbb *Pholeioxodes*-fajhoz hasonlóan – nincsenek auriculáik és kiemelkedő belső tövisük az I. csípőn.

4.2.2.1. ábra. A vizsgálatunkban nyert (vastagon kiemelt) *cox1* haplotípusok filogenetikai viszonyai. A piros szín (#1) a *Pholeoixodes*, míg a lila szín (#2) az *Eschatocephalus* alnemeket jelöli. A fajnév és a hozzáférési szám között az ország neve olvasható (angolul).



4.2.2.2. ábra. A vizsgálatunkban nyert (vastagon kiemelt) 16S rRNS haplotípusok filogenetikai viszonyai. A piros szín (#1) a *Pholeoixodes*, míg a lila szín (#2) az *Eschatocephalus* alnemeket jelöli. A fajnév és a hozzáférési szám között az ország neve olvasható (angolul).



A fenti eredményeket érdemes földrajzi összefüggésben is megvilágítani. Jóllehet néhány (de nem az összes) *cox1* mitochondrialis vonal esetében volt földrajzi elkülönülés, a 16S rRNS gén szekvencia- és filogenetikai vizsgálata ezt nem erősítette meg. Ez arra utalhat, hogy az egyes *Pholeoixodes*-fajokon belüli genetikai kicserélődés nem korlátozott az itt elemzett európai populációik között, vagyis e kullancsfajok nem oszthatók földrajzilag elkülönülő populációkra, hanem folyamatos génáramlás részesei. Ennek kiemelt háttértényezői között szerepelhet, hogy e kullancsok egyik legfontosabb gazdafajának, a vörös rókanak (*Vulpes vulpes*) a populációi Európa-szerte kapcsolatban vannak és keverednek, ami lehetővé teszi a génáramlást és maga után vonja a térbeli mintázat csaknem teljes hiányát (Teacher és mtsai, 2011). Ugyanakkor az aranysakál (*Canis aureus*) elterjedése Nyugat-Európa irányában (Arnold és mtsai, 2012) szintén hozzájárulhatott az itt vizsgált kullancsfajok szóródásához. Ugyanakkor *cox1* és 16S rRNS genetikai különbséget mutattunk ki az *I. hexagonus* fajon belül két térség (Németország-Ausztria és Magyarország-Balkán) között, ami az *I. hexagonus* fő gazdáinak, két sünfajnak a földrajzi elkülönüléséből fakadhatott (tehát európai sün, *Erinaceus europaeus* Németországban vs. keleti sün, *E. roumanicus* Magyarországon és Délkelet-Európában).

4.2.3. A *Haemaphysalis erinacei* filogenetikai vizsgálata

Előzmények

A *Haemaphysalis erinacei* Pavesi, 1884 Európától (mediterrán térség) egészen Közép-Ázsiáig elterjedt és adult stádiumban főként ragadozókat, sünféléket fertőz (Guglielmone és mtsai, 2014). Azon kevés kullancsfaj közé tartozik, amelyeknek valid alfajai vannak. Az alfaj általános definíciója magában foglalja a földrajzi elkülönülést, de a morfológiai megkülönböztetettséget is. Ez utóbbi nem olyan egyértelmű a mediterrán *H. e. erinacei* és a délkelet-európai, közel-keleti elterjedésű *H. e. taurica* között, mint ez utóbbi és a közép-ázsiai *H. e. turanica* között. Hasonló okból, egyes szerzők három, míg mások négy alfajt ismernek el e fajon belül (Hoogstraal, 1959; Camicas és mtsai, 1998). Az ilyen és hasonló ellentmondások dacára eddig nem végezték el a *H. erinacei* alfajainak molekuláris és filogeográfiai összehasonlítását, amit ezzel a vizsgálattal igyekeztünk pótolni. Munkánk fő apropója a faj első megtalálása volt Romániában.

Molekuláris módszerek: A, B

Eredmények és megbeszélés

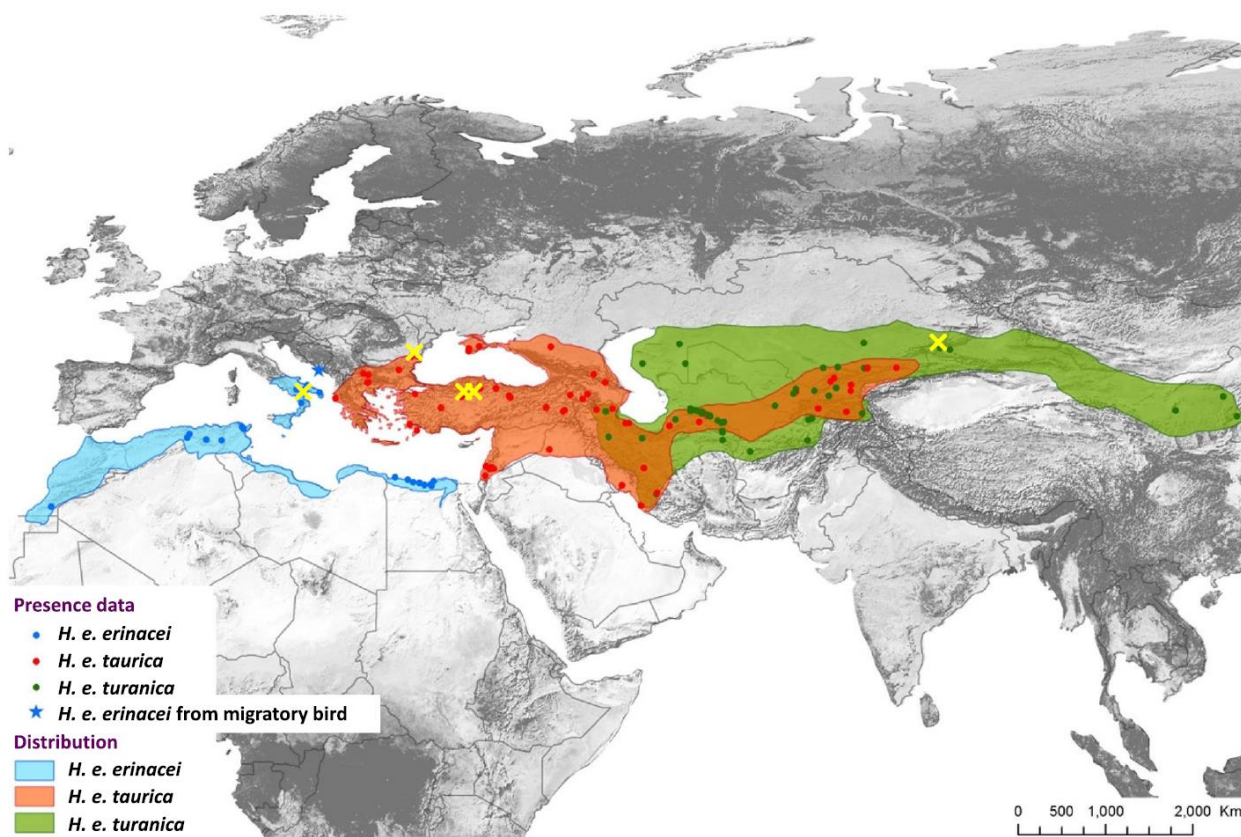
E tanulmányban 26 *H. erinacei* példányt vizsgáltunk, amelyek mindhárom alfajt képviselték. A Romániában gyűjtött *H. e. taurica* *cox1* gén szekvenciája 100%-os azonosságot mutatott ugyanezen alfaj Törökországból (Tokat tartomány) származó példányával, és 99,4%-ban volt azonos a *H. e. erinacei* olaszországi mintájával, de csak 94,6-95,1%-ban egyezett a *H. e. turanica* alfaj egyedeivel Kínából (4.2.3.1. táblázat). A 16S rRNS gén szekvenciáit véve alapul, a Romániában gyűjtött *H. e. taurica* 99,3%-ban volt azonos ugyanezen alfaj egyik, Törökországból (Tokat tartomány) származó egyedével, és 98-98,3%-ban az olaszországi *H. e. erinacei* mintával. Másfelől, a romániai *H. e. taurica* 16S rRNS gén szakasza csak 92,7–95,3%-ban egyezett a *H. e. turanica* alfaj megfelelő szekvenciáival Kínából.

4.2.3.1. táblázat. A vizsgálatban használt *Haemaphysalis erinacei* minták adatai. A szekvencia azonosság az inverz színnel kiemelt romániai mintához képest értendő.

<i>Ha. erinacei</i> alfaj	Ország	Gyűjtési hely	Forrás	Cox1 szekvencia azonosság	Cox1 szekvencia génbanki szám (izolátum, n = szám ha > 1)	16S rRNA szekvencia azonosság	16S szekvencia génbanki szám (izolátum)
<i>Ha. e. turanica</i>	Kína	Alataw Hágó	<i>Vormela peregusna</i>	605/636 bp (95.1%)	KU880621 (ABL1)	355/374 bp (94.9%)	KU880549 (ABL1)
		Alataw Hágó		605/636 bp (95.1%)	KU880609 (ABL6)	-	-
		Alataw Hágó		603/636 bp (94.8%)	KU880620 (ABL5-3)	-	-
		Alataw Hágó		603/636 bp (94.8%)	KU880608 (ABL5-1)	-	-
		Alataw Hágó		604/636 bp (95%)	KU880607 (ABL2)	383/406 bp (94.3%)	KU880556 (ABL2)
		Alataw Hágó		604/636 bp (95%)	KU880559 (ABL5)	-	-
		Alataw Hágó		577/608 bp (94.9%)	KU880616 (ABL5-2)	-	-
		Alataw Hágó		575/608 bp (94.6%)	KU880615 (ABL4)	352/374 bp (94.1%)	KU880550 (ABL4)
		Alataw Hágó		605/636 bp (95.1%)	KU880589 (ALSK186-1)	-	-
		Alataw Hágó		604/636 bp (95%)	KU880573 (ALSK186)	351/374 bp (93.9%)	KU880551 (ALSK186)
		Alataw Hágó		603/636 bp (94.8%)	KU880572 (ALSK185)	-	-
		Alataw Hágó		-	-	384/405 bp (94.8%)	KU880555 (ABL1-1)
		Alataw Hágó		-	-	386/405 bp (95.3%)	KU880557 (ABL10)
		Alashankou		-	-	356/384 bp (92.7%)	KR053302 (1)
		Alashankou		-	-	361/382 bp (94.5%)	KR053303 (2)
		Alashankou		-	-	362/382 bp (94.8%)	KR053304 (3)
Alashankou	-	-	361/383 bp (94.3%)	KR053305 (4)			
<i>Ha. e. taurica</i>	Románia	Canaraua Fetii	barlang bejárata	636/636 bp (100%)	KU885986 (n=1)	404/404 (100%)	KU885987
<i>Ha. e. taurica</i>	Törökország	Tokat térség	<i>Homo sapiens</i>	636/636 bp	KX901844 (n=2)	401/404 bp (99.3%)	KX901845
		Sivas térség	<i>Erinaceus concolor</i>	not successful	- (n=2)	391/406 bp (96.3%)	KX901846
<i>Ha. e. erinacei</i>	Olaszország	Basilicata mellett	<i>Martes foina</i>	632/636 bp (99.4%)	KX237631 (n=3)	397/404 bp (98.3%)	KX237632
				632/636 bp (99.4%)	KX237631	397/405 bp (98%)	KX237633

Mindent egybevéve, a romániai, törökországi *H. e. taurica* és az olaszországi *H. e. erinacei* *cox1* és 16S rRNS szekvenciái között alacsony (2% alatti) eltérés volt. Ez megfelel a szóban forgó két alfaj allopatrikus elkülönülésének (4.2.3.1. ábra). Hasonló mértékű (1,2% körüli) fajon belüli genetikai variációt írtak le más kullancsfajok, például az *Ixodes scapularis* egymástól nagy földrajzi távolságban gyűjtött mintáinál ugyanezen 16S rRNS régióban (Krakowetz és mtsai, 2014). Azonban a romániai *H. e. taurica* és a közép-ázsiai *H. e. turanica* közötti szekvencia eltérés nagy volt (5,4%-ig a *cox1* génben, és 7,3%-ig a 16S rRNS génben; 4.2.3.1. táblázat), tehát meghaladta a közeli rendszertani rokonságban álló kullancsfajok közötti várható (átlagos) eltérést (Lv és mtsai, 2014). Összehasonlításképpen, az *I. inopinatus* (KM211790) és az *I. ricinus* (GU074592) közötti 16S rRNS genetikai azonosság 98,2% (383/390 bp), ami csupán 1,8% különbséget jelent (Estrada-Peña és mtsai, 2014). Amikor ebben az összefüggésben több kullancsfaj között hasonlították össze a faji határokat (Lv és mtsai, 2014), az egyes fajokat elválasztó szekvencia eltérés mértéke átlagosan 5,3% volt a 16S rRNS gén esetében, vagyis jóval alacsonyabb az itt, a *H. e. taurica* és *H. e. turanica* között mért 7,3% eltérésnél.

4.2.3.1. ábra. A három *Haemaphysalis erinacei* alfaj földrajzi elterjedtsége. Vizsgálatunk mintáinak származási helyét sárga kereszt jelöli.

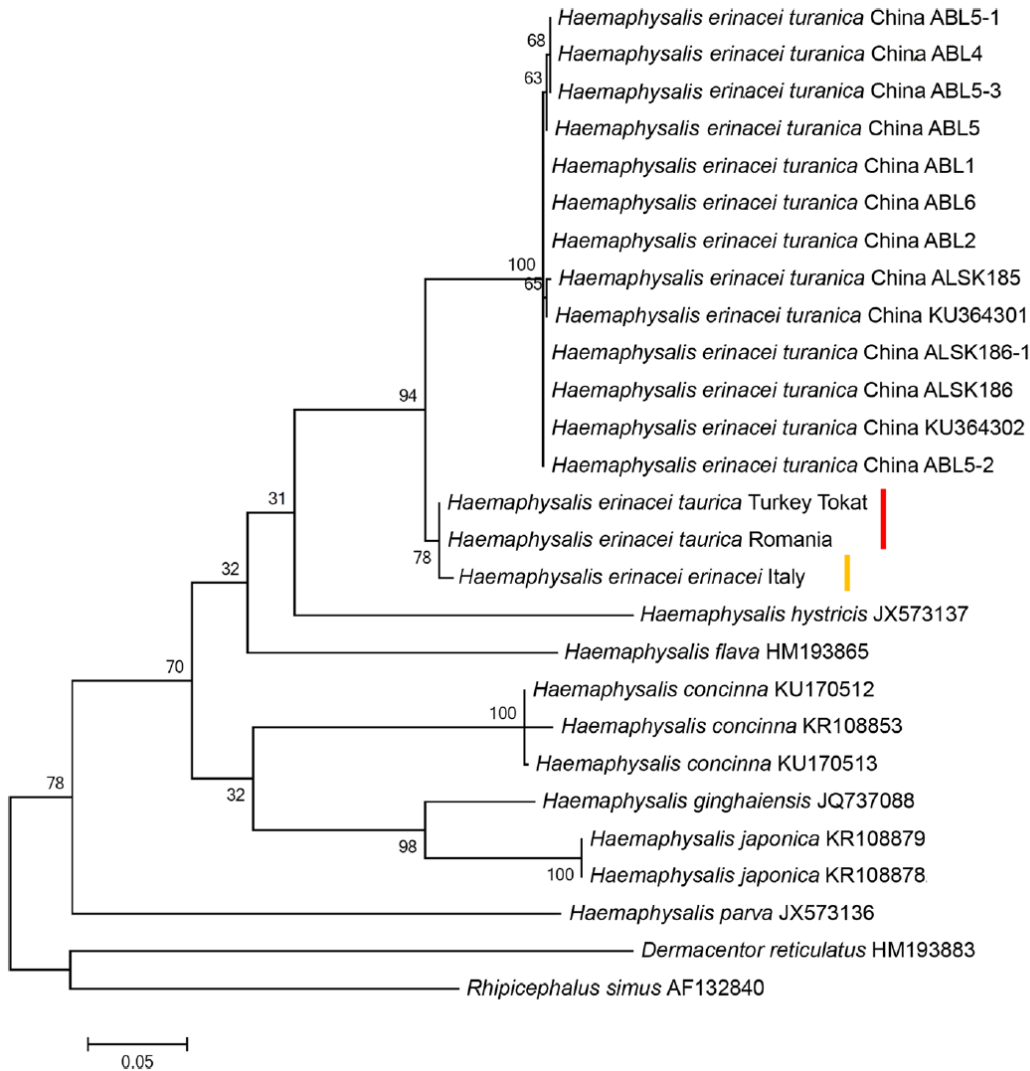


A *cox1* törzsfaj topológiája jól tükrözte a *H. e. taurica*, *H. e. erinacei* és *H. e. turanica* alfajok közötti eltérő nukleotidok számát/százalékát. Nevezetesen, a *H. e. taurica* és *H. e. erinacei* mintái egymáshoz közel csoportosultak, de távol a *H. e. turanica* alfajétól (4.2.3.2. ábra). Ez az elkülönülés magas (94%) támogatottságot kapott, és időben (az ágak hossza alapján) megelőzte a *H. e. taurica* és a *H. e. erinacei* szétválását (4.2.3.2. ábra). A 16S rRNS gén szekvenciák filogenetikai elemzése megerősítette ezeket a viszonyokat, tehát a *H. e. turanica* összes haplotípusa egy kládba csoportosult, valamennyi *H. e. taurica* és *H. e. erinacei* minta testvércsoportjaként (4.2.3.3. ábra).

Érdekes eredmény volt, hogy két, Törökországból (Sivas tartomány) származó nőtény, amelyeket *H. e. taurica* alfajúként azonosítottunk, 16S rRNS szekvenciája alapján közelebbi rokonságban állt a *H. e. turanica* alfaj kínai példányaival (maximum 396/406 bp = 97,5% azonosság), mint a *H. e.*

taurica alfaj romániai példányával (96,3% azonosság) (4.2.3.1. táblázat). Mindazonáltal e két minta filogenetikailag közelebb csoportosult a *H. e. taurica*, mint a *H. e. turanica* alfajhoz (4.2.3.3. ábra). Ez külön genetikai vonalak létezését jelzi a *H. e. taurica* alfajon belül.

4.2.3.2. ábra. A *Haemaphysalis*-fajok filogenetikai viszonyai a *cox1* gén alapján. Vizsgálatunk mintái az ország (angolul) és az izolátum nevével szerepelnek (lásd 4.2.3.1. táblázat). A függőleges vörös, sárga és kék vonalak a *H. e. taurica*, *H. e. erinacei* és *H. e. turanica* alfajokat jelzik.

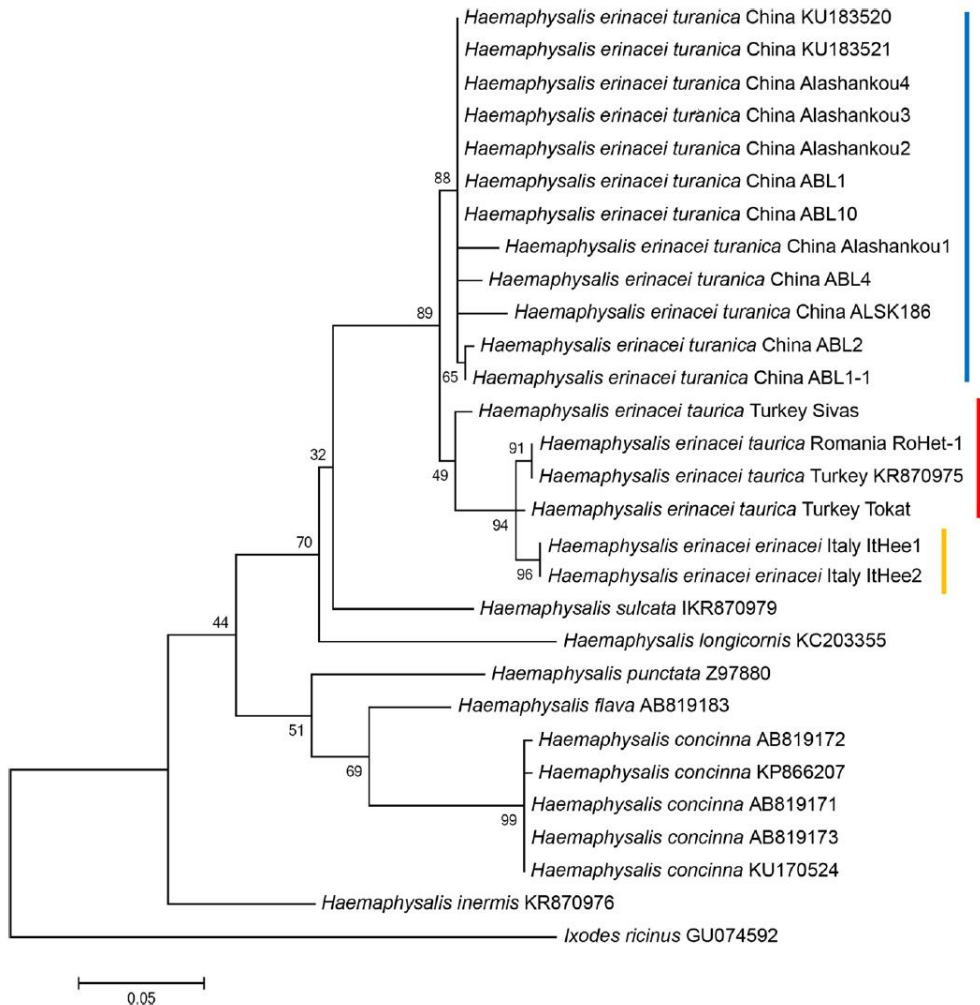


Földtörténeti összefüggésben úgy becsülik, hogy a *H. punctata* és a *H. flava* elválása kb. 40 millió évvel ezelőtt történhetett (Gou és mtsai, 2013). Ehhez az eseményhez képest, ahogy a 16S rRNS gén törzsfájából következtethető (4.2.3.3. ábra), a *H. e. turanica* elkülönülése a *H. e. taurica/erinacei* alfajoktól később történhetett.

Számos tényező hozzájárulhatott ehhez az elváláshoz és a különbségek elmélyüléséhez, fennmaradásához. Európa déli félszigetei a jégkorszakok során fő menedékhelyekként (refúgiumokként) szolgáltak, ahonnan azután az állatfajok genetikailag elkülönült csoportjai származtak (Hewitt, 1999). Ezt példázhatja a *H. e. erinacei* és a *H. e. taurica* is. Hasonlóképpen, a Kaszpi-tengerrel összefüggő jégtakaró okozhatta a *H. e. taurica* és a *H. e. turanica* kelet-nyugati irányú szétválását. A későbbiekben pedig az utóbbiak populációi közötti rendszeres genetikai keveredést legalább két tényező gátolhatta. Először is, a madarak csak ritkán hordoznak *H. erinacei* fajba tartozó kullancsokat (Tovornik és Cerný, 1974), míg tipikus gazdái (vagyis a ragadozók és a sünök) nem vándorolnak illetve tesznek meg nagy

távolságot, ami megakadályozza a kontinentális régiók közötti génkicserélődést. Összehasonlítás-képpen, a madarakat is gyakran fertőző *Haemaphysalis*-fajok *cox1* vagy 16S rRNS gén szekvencia eltérései minimálisak még nagyon nagy földrajzi távolságban is: például a *H. concinna* (4.2.1. fejezet) vagy a *H. punctata* esetében (utóbbinál a spanyol, török és kínai minták a Z97880, KR870978 és KF547980 génbanki hozzáférési számon 100%-os 16S rRNS gén azonosságot mutatnak).

4.2.3.3. ábra. A *Haemaphysalis*-fajok filogenetikai viszonyai a 16S rRNS gén alapján. Vizsgálatunk mintái az ország (angolul) és az izolátum nevével szerepelnek (lásd 4.2.3.1. táblázat). A függőleges vörös, sárga és kék vonalak a *H. e. taurica*, *H. e. erinacei* és *H. e. turanica* alfajokat jelzik.



Ráadásul, olyan földrajzi régiókban, ahol a *H. e. taurica* és a *H. e. turanica* előfordulása átfed, és mindkettő gazdái gyakoriak, e két alfaj más-más élőhelyeket népesít be (Filippova és mtsai, 1993), ami valószínűleg tovább csökkenti a populációik közötti génáramlás esélyeit.

Következésképpen, a *H. erinacei* alfajok általunk végzett (világviszonylatban első) filogenetikai összehasonlítása az ellen szól, hogy a három alfaj azonos taxonómiai rangú (mint jelenleg). Nevezetesen, a *H. e. turanica* alfaj Kínából származó egyedei és a *H. e. taurica* alfaj Romániából származó egyedei közötti genetikai eltérés mértéke meghaladja a rendszertanilag közeli fajok közötti átlagosan megállapítható különbséget. Ez arra enged következtetni, hogy – különösen a régóta ismert morfológiai különbségek figyelembevételével – ezek külön fajt képviselnek. Munkánk alapján tehát a *H. erinacei* alfajok taxonómiai státuszának revíziója szükséges, optimálisan nagy kiterjedésű földrajzi régiójának egészét felölelő, magasabb számú mintával.

4.2.4. A *Babesia vesperuginis* filogenetikai vizsgálata

Előzmények

A *Babesia vesperuginis* az egyetlen olyan piroplasma, amelyről ismert, hogy denevéreket fertőz. Azt feltételezik, hogy – az emlősöket fertőző babesiák túlnyomó többségével szemben – nem kullancs, hanem óvontag (*Argas vespertilionis*) vektorral rendelkezik (Gardner és Molyneux, 1987). Nemrég két tanulmány is született a *B. vesperuginis* filogenetikai viszonyairól, és mindkettő alaphelyzetben mutatta a *Babesia sensu stricto* kládon belül (4.5.2. fejezet; Corduneanu és mtsai, 2017). Mindazonáltal, e korábbi törzsfák nem szerepelt minden fontos piroplasma csoport, és/vagy csak egy génre (18S rRNS) épültek. Újabb vizsgálatunk célja tehát az volt, hogy első ízben nyerjünk *cox1* szekvenciát a *B. vesperuginis* hazai mintájából, és ezt megvizsgáljuk szélesebb filogenetikai összefüggésben.

Molekuláris módszerek: K, L

Eredmények és megbeszélés

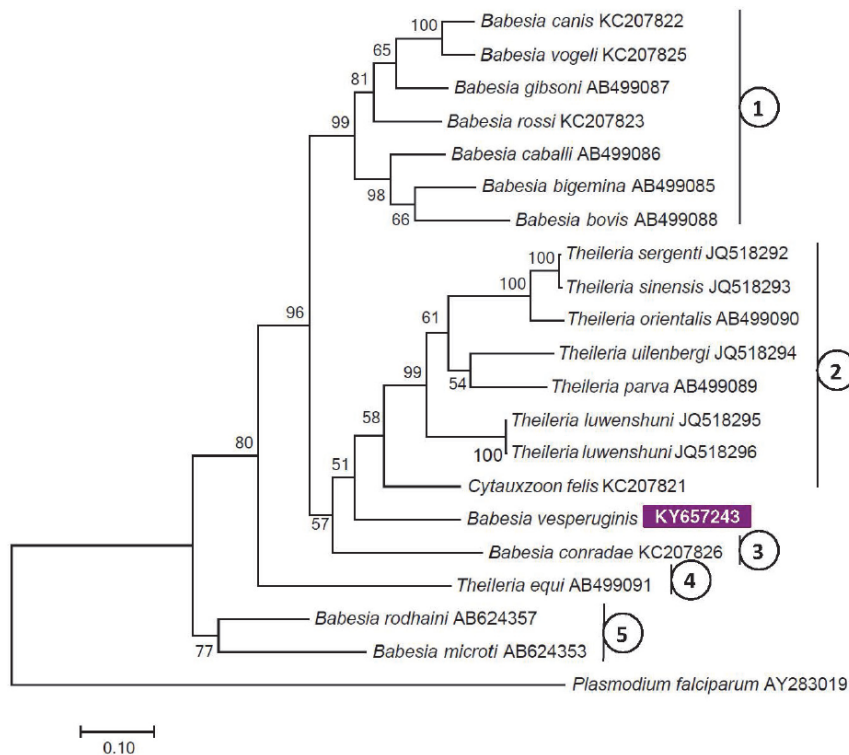
Ez a *B. vesperuginis* első, átfogó filogenetikai összehasonlítása, mely két génre épül. Vizsgálatunk során a piroplasma *cox1* génjét először sikerült felerősíteni denevér óvontagokból (*A. vespertilionis*), illetve első alkalommal magyarországi mintából. Mind a négy, 18S rRNS gén PCR-ben pozitív minta azonos *cox1* szekvenciát eredményezett. A *B. vesperuginis* *cox1* szekvenciája (KY657243) legnagyobb hasonlóságot a *Cytauxzoon felis* *cox1* szekvenciájával (KC207821) mutatott (79,1%, 709/896 bp), és kisebb volt a *sensu stricto* *Babesia*-fajok (ennek tartománya 74,9-77,6% volt a *B. bigemina* fajától [AB499085] a *B. canis* fajéig [KX712138]) és a *Theileria*-fajok *cox1* szekvenciáival (ami 74,2-77,5%-ig terjedt, a *T. sinensis* [JQ518293] és a *T. luwenshuni* [JQ518295] figyelembevételével). A *cox1* szekvenciában talált hézagok száma maximum 10 illetve 14 volt a *Babesia*- illetve *Theileria*-fajokkal illesztve, míg nem volt hézag a *C. felis* fajjal összevetve. A *B. vesperuginis* és a *B. conradae* (nyugati *Babesia* csoport) *cox1* szekvenciái közötti azonosság mindössze 73.2% (659/900 bp) volt, de ebben az összehasonlításban is csak két hézag volt.

Ez összhangban van a *B. vesperuginis* óvontagból nyert 18S rRNS gén szekvenciájának (KY657241) összehasonlító elemzésével: e tekintetben a hasonlóság legnagyobb fokú a "csoporton kívüli theileriák" közül *T. bicornis* fajjal volt (AF499604: 422/455 bp = 92,7% azonosság); ezt követte a "prototheilerida" *B. conradae* (AF158702: 416/450 bp = 92,4% azonosság) és a *C. felis* (AF399930: 409/450 bp = 90,9% azonosság) (szekvenciák és csoportnevek forrásai: Criado-Fornelio és mtsai, 2003b; Lack és mtsai, 2012; 4.8.3. fejezet). Másfelől, a *B. vesperuginis* 18S rRNS szekvenciája 90%-nál kisebb hasonlóságot mutatott a szűkebb értelemben vett *Babesia*- és *Theileria*-fajokkal. Az azonosság százalékanak ebben a csökkenő sorrendjében a szekvencia hézagok száma relatíve kevés volt a *T. bicornis*, *B. conradae* és *C. felis* fajokkal illesztve (10, 4 és 8), míg közepes (20-29) vagy sok (28–58) a *Theileria*- és *Babesia*-fajokkal összehasonlítva.

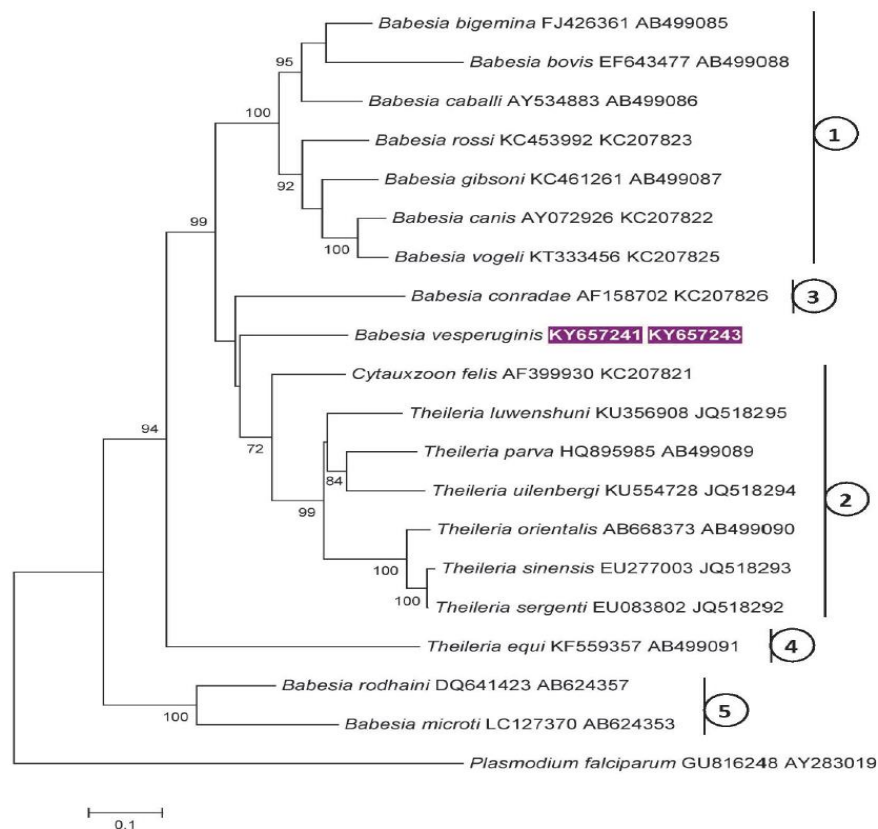
A filogenetikai vizsgálat során kapott törzsfák topológiája is jól tükrözte a fenti szekvencia hasonlóságokat és hézagszámokat. Nevezetesen, *cox1* génje alapján a *B. vesperuginis* a *Babesia sensu stricto* kategórián kívülre került (96% támogatottság mellett), közel a *C. felis* fajhoz és a theileriákhoz (4.2.4.1. ábra). Ha a *C. felis* fajt kihagytuk az elemzésből, a *B. vesperuginis* (a régebbi álláspontnak megfelelően) továbbra is a szorosabb értelemben vett babesiák filogenetikai csoportjába tartozott (nem közölt törzsfá). Ez egyértelműen jelzi, hogy a *B. vesperuginis* pontos rendszertani helyét definiálni hivatott filogenetikai vizsgálatokból nem szabad kihagyni sem a *C. felis* fajt, sem a fontosabb piroplasma csoportok legalább néhány képviselőjét.

Az összefűzött (konkatenált) *cox1* és 18S rRNS gén szekvenciák filogenetikai vizsgálata mindkét alkalmazott modellel hasonló topológiájú törzsfát eredményezett. Nevezetesen, a *B. vesperuginis* a klasszikus babesiáktól külön ágra került, magas támogatottsággal (4.2.4.2. ábra: 99%, 4.2.4.3. ábra: 88%). Ezen felül a *B. vesperuginis* vagy a "prototheilerida" *B. conradae* és a theileriák, *C. felis* alkotta filogenetikai csoport mellé került (4.2.4.2. ábra), vagy a *B. conradae* fajjal a Theileriidae család kládjának testvércsoportját alkotta (4.2.4.3. ábra).

4.2.4.1. ábra. A piroplasmák csoportjainak ML törzsfája a *cox1* szekvenciák alapján. A vizsgálatban nyert szekvenciát inverz lila szín jelöli. Csoportok (Schreeg és mtsai, 2016 után): 1 = *Babesia sensu stricto*; 2 = *Theileria sensu stricto* és *Cytauxzoon*; 3 = nyugati *Babesia* csoport; 4 = *Th. equi*; 5 = *Babesia microti* csoport.

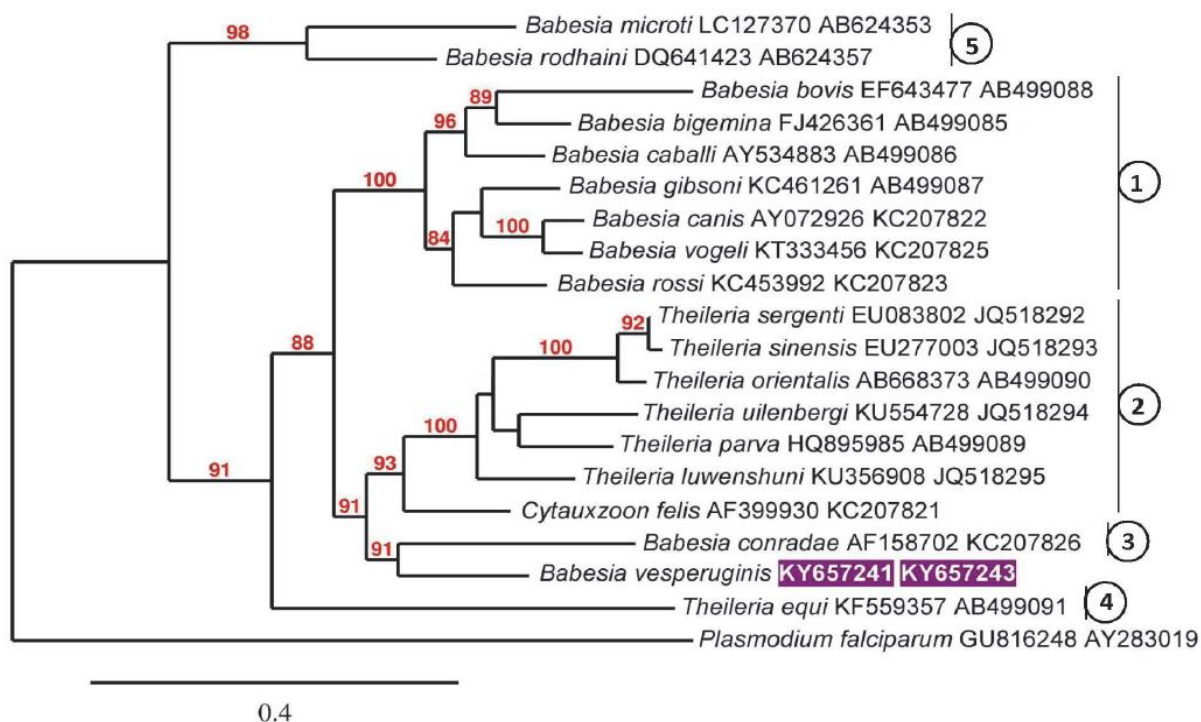


4.2.4.2. ábra. A piroplasmák csoportjainak (lásd 4.2.4.1. ábra) ML (GTR modell) törzsfája az összefűzött *cox1*, 18S rRNS szekvenciák alapján. A vizsgálatban nyert szekvenciát inverz lila szín jelöli.



A szóban forgó fajok morfológiai és fejlődéstani jellegzetességei alátámasztják a *B. vesperuginis* fenti filogenetikai viszonyait, tehát hogy közelebbi rokonságban van a theileriákkal, mint a babesiákkal, és legközelebbi rokona a *C. felis* és a *B. conradae* lehet. Konkrétan, bár a *B. vesperuginis* fejlődésmenetét egészében véve nem ismerjük, leírták, hogy léteznek négy magvú osztódó alakjai ("tetrádok") (Gardner és Molyneux, 1987). Ez emlékeztet arra, amit a *C. felis* (Glenn és mtsai, 1982) és a *B. conradae* (Kjemtrup és mtsai, 2006) fajok vonatkozásában említ a szakirodalom. Ezzel szemben, a *Babesia sensu stricto* csoport képviselőire a vörösvértetekben való kettéosztódás jellemző (Conrad és mtsai, 2006).

4.2.4.3. ábra. A piroplasmák csoportjainak ML (HKY modell) törzsfája az összefűzött *cox1* és 18S rNS szekvenciák alapján. A jelöléseket lásd 4.2.4.1. ábra.



Ismert, hogy a 18S rNS gén széles körben elfogadott és alkalmazott genetikai marker a Piroplasmida rend képviselői közötti filogenetikai viszonyok feltérképezésében, és a csoport taxonómiájának tisztázását célzó tanulmányok nagy többsége is ezt vette figyelembe (Schreeg és mtsai, 2016). Azonban a marker szinte kizárólagos használata következtelenségekhez vezetett, mivel a filogenetikai vizsgálatok eredménye ellentmondó volt bizonyos *Babesia*- és *Theileria*-fajok elhelyezésében. Ezért a mitochondriális genom szekvenciáinak (amilyen a *cox1*) elemzése – a 18S rNS gén mellett vagy azzal összefűzve – hasznosnak bizonyult a piroplasmák törzsfajlódási viszonyainak megállapításában, a taxonok elkülönítésében és az evolúciós viszonyok feltárásában (Gou és mtsai, 2012; Schreeg és mtsai, 2016).

Ez az első olyan, a fentiek szellemében végzett átfogó analízis, amelybe a különleges piroplasmát, a *B. vesperuginis* fajt szintén bevették. Eredményünket későbbi tanulmányunk is igazolta (4.5.4. fejezet). Összességében, a vizsgálatunk során kapott törzsfák azokat a filogenetikai viszonyokat tükrözik (tehát ugyanazon öt fő piroplasma csoport elkülönülését), amelyeket más szerzők nemrég a *cox1* aminosav sorrendre vagy a konkatenált mitochondriális + 18S rNS gén nukleotid szekvenciákra épülő törzsfák esetében kaptak (Schreeg és mtsai, 2016).

Következtetésképpen, az elvégzett *cox1* szekvencia összehasonlítások és törzsfaj elemzések egyértelműen azt támasztják alá, hogy a *B. vesperuginis* – nevével ellentétben – nem tagja a szorosabb értelemben vett *Babesia*-fajok filogenetikai csoportjának, hanem külön ághoz tartozik, legközelebbi rokonságban a *C. felis* és a *B. conradae* fajokkal. Ennélfogva, a *B. vesperuginis* egyedülálló és taxonómiaiul fontos fajnak számít, amelynek szerepelnie kell a Piroplasmida rend filogenetikai viszonyainak átfogó vizsgálatát célzó tanulmányokban.

4.3. Kullancsfajok tér- és időbeli előfordulása

4.3.1. Természetes élőhelyek hatása a kullancsfajok előfordulására, szezonitására hazánkban

Előzmények

Hazánkban az utolsó, országos szintű kullancsfelmérést mintegy 50 éve végezték (Janisch, 1959). Azóta is közöltek eredményeket a kullancsok hazai előfordulásáról, de különféle gazdafajokról (kutyákról: Földvári és Farkas, 2005; rókákról: Széll és mtsai, 2006), és ilyen esetben a kullancsok pontos származási helye, eredeti élőhely típusa nem állapítható meg. Jelen vizsgálatunk célja ezért olyan országos felmérés volt, amelynek során a növényzetről gyűjtöttünk kullancsokat és így ez utóbbi adatokat is figyelembe tudtuk venni.

Eredmények

4.3.1.1. táblázat. A növényzetről gyűjtött kullancsok száma faj, ivar vagy fejlődési stádium szerint.

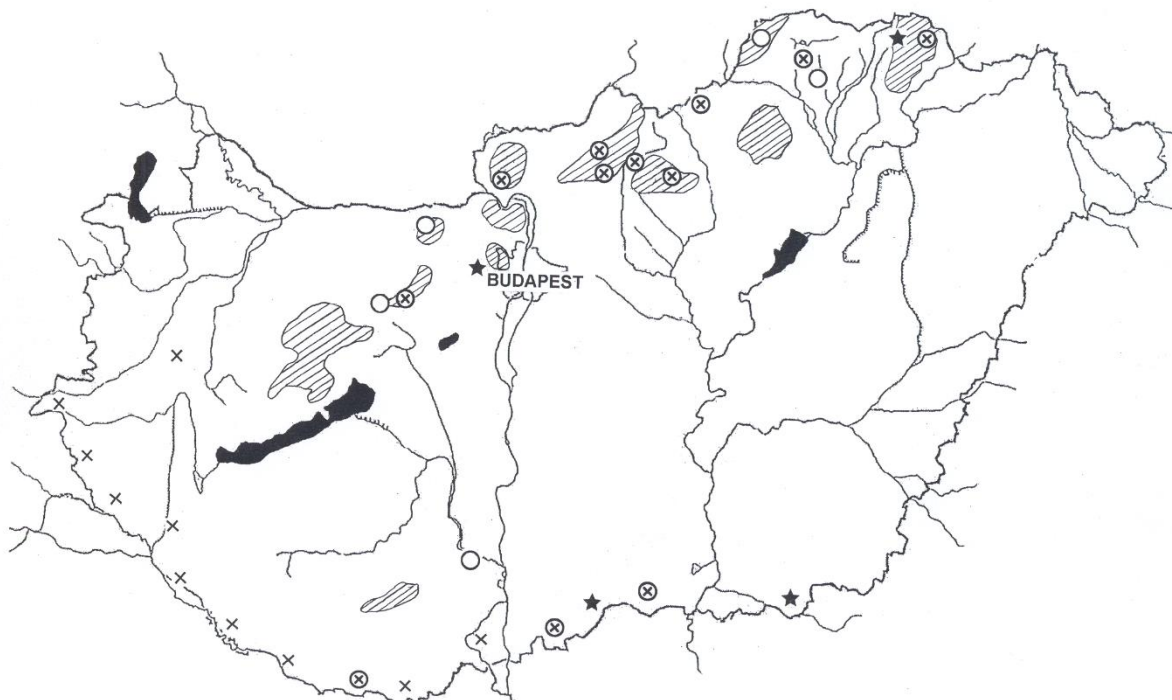
	Hímek	Nőstények	Nymphák	Lárvák	Összes	Helyek
<i>Ixodes ricinus</i>	829	957	306	24	2116	37
<i>D. marginatus</i>	158	211	–	–	369	18
<i>D. reticulatus</i>	127	234	–	–	361	24
<i>H. inermis</i>	117	198	–	–	315	12
<i>H. concinna</i>	86	48	73	52	259	16
<i>H. punctata</i>	13	8	1	–	22	3

4.3.1.2. táblázat. A periodikusan vizsgált három élőhelytípusban gyűjtött 1760 kullancs faji megoszlása. Minden szám az egy alkalommal gyűjtött adultokat jelenti, míg a nymphák száma zárójelben szerepel. A csillag (*) a lárvák megjelenését jelöli. Az I-es és II-es biotópokat részben száraz vegetáció jellemezte, utóbbiban tölgyfákkal, míg a III-as típust friss, zöld aljnövényzet és tölgyfák.

Élőhely:	március közepe	március-április fordulója	április közepe	április-május fordulója	május közepe	május-június fordulója
I-es típus. Legelők széle bozótos domboldalon						
<i>Ixodes ricinus</i>	–	–	–	10	56	16*
<i>D. marginatus</i>	43	63	17	7	1	1
<i>D. reticulatus</i>	1	6	1	–	–	–
<i>H. concinna</i>	–	–	–	–	– (2)	1 (6)
II-es típus. Rétek széle hegyi erdőkben						
<i>Ixodes ricinus</i>			55	119	60	31
<i>D. marginatus</i>			30	59	6	1
<i>D. reticulatus</i>			22	23	3	–
<i>H. inermis</i>			24	119	18	5
<i>H. concinna</i>			2	11 (1)	14 (1)	15 (22)
<i>H. punctata</i>			2	–	–	–
III-as típus. Széles ösvény hegyi erdőkben						
<i>Ixodes ricinus</i>			33	195	420	73*
<i>H. inermis</i>			9	20	54	1
<i>H. concinna</i>			–	5 (7)	35 (6)	7 (8)*
<i>H. punctata</i>			3	5	3 (1)	1

2007 márciusa és júniusa között összesen 3442 kullancsot gyűjtöttünk, amelyek hat fajba tartoztak (4.3.1.1. táblázat). Az *Ixodes ricinus* mind a 37 gyűjtési helyen előfordult, közülük néhányon egyedüli fajként (4.3.1.1. ábra: csillagok). A maximális tengerszint feletti magasság, ahol nymphái és adultjai előfordultak, 900-1000 m között volt (Mátra). Helyi példányszáma alapján az *I. ricinus* leginkább dús, zöld növényzetű (nedvesebb) erdei élőhelyen fordult elő, kevésbé a szárazabb vegetációjú legelők vagy rétek mentén (4.3.1.2. táblázat).

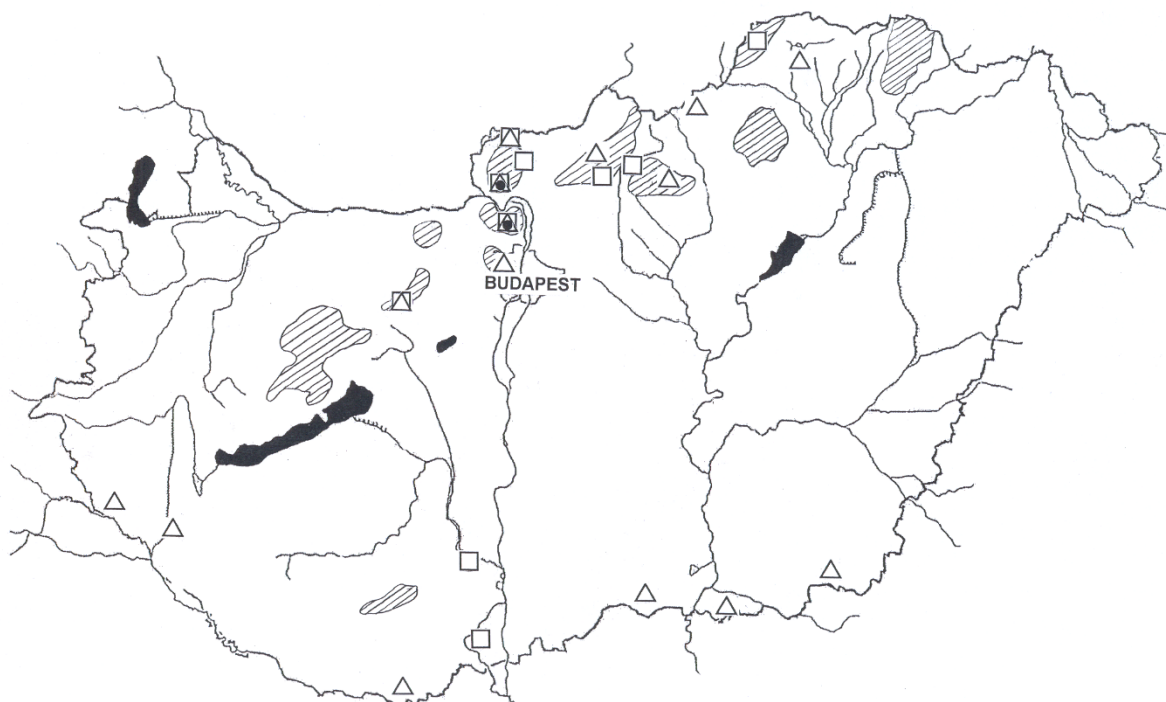
A két *Dermacentor*-faj közül csak a *D. reticulatus* fordult elő Délnyugat-Magyarországon, míg néhány helyen (többnyire legelőkön) az ország északi részén csak a *D. marginatus* került elő (4.3.1.1. ábra). E két faj a tavaszi gyűjtés alatt egyidejűleg fordult elő (4.3.1.2. táblázat), csak részben szárazabb növényzettel jellemezhető helyeken és 900-1000 méteres tengerszint feletti magasságig (Mátra).



4.3.1.1. ábra. Az *Ixodes ricinus* hazai előfordulása (minden gyűjtési helyen; ahol csillag jelöli, egyedüli fajként) és a két *Dermacentor*-faj lokalizációi (x: *D. reticulatus*, O: *D. marginatus*).

A felmérésben gyűjtött három *Haemaphysalis*-faj közül a *H. inermis* és a *H. concinna* élőhelyei kevésbé voltak regionálisak (tehát e fajok az ország több részében is gyűjthetők voltak), szemben a *H. punctata* fajjal, amelyet mindössze két élőhelyen, hazánk egyetlen (északi) térségében találtunk meg (4.3.1.2. ábra). A tölgyfákkal vegyes lombhullató erdők rétjei, ösvényei mentén vizsgált élőhelyeken (4.3.1.2. táblázat: II. és III. típusú biotópok) a *H. punctata* aránya (6,3%, 95% CI 1,31–17,20) szignifikánsan ($P = 0,007$) alacsonyabb volt a *H. inermis* (46,1%, 95% CI 37,25–55,12) és a *H. concinna* (37,9%, 95% CI 20,69–57,74) fajokhoz képest. Ezen élőhelyek közül (más *Haemaphysalis*-fajok hiányában) a *H. inermis* legmagasabb helyi arányát (65,1%, 95% CI 52,03 – 76,66) egy dombok közötti, erdős völgyben érte el, ahol sűrű, zöld aljnövényzet volt. Ezzel szemben a *H. punctata* a helyben gyűjtött kullancsok közül maximális arányát (40%, 95% CI 12,16 – 73,76) egy dél-felé néző, kis, bozótos hegyi lejtőn érte el, amelyet gyér, száraz növényzet és vulkáni kövek borítottak.

A *D. marginatus*, *D. reticulatus* és *H. inermis* példányai csak adultok voltak. A fennmaradó három faj nympháit a következő összesített arányban gyűjtöttünk: *I. ricinus* esetében 14,5% (95% CI 12,99 – 16,03), a *H. concinna* esetében 28,5% (95% CI 23,06 – 34,36), míg a *H. punctata* esetében 4,5% (95% CI 0,12 – 22,84). A periodikusan vizsgált élőhelyek mindhárom típusában a *H. concinna* nymphák száma felülmúlta az adultokét május végére (4.3.1.2. táblázat). Lárvákat csak az *I. ricinus* és a *H. concinna* fajokból találtunk a vizsgált időszakban (május végétől), mindkét faj esetében két helyen.



4.3.2. ábra. A *Haemaphysalis*-fajok hazai előfordulása (△: *H. concinna*, □: *H. inermis*, ●: *H. punctata*).

A négy leggyakoribb fajból (*I. ricinus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus* és *H. inermis*) a nőstények voltak túlsúlyban a hímekhez képest (4.3.1.1. táblázat), és ez az egész vizsgálati periódusban megfigyelhető volt (tehát nem volt szignifikáns különbség vagy eltolódás az ivararányban a hónapok során: nem közölt adatok). Ugyanakkor jelentősen ($P = 0,04$) több volt a *D. reticulatus*, mint a *D. marginatus* nőstények száma (4.3.1.1. táblázat).

Ezzel ellentétben, a *H. concinna* és a *H. punctata* hímjei gyakoribban voltak a nőstényeknél (4.3.1.1. táblázat). Részletesebben, szignifikánsan ($P = 0,022$) több *H. concinna* hímot gyűjtöttünk május közepéig (70% hím, 100-ból 70 példány), mint május vége és június közepe között (47% hím, 34-ből 16 egyed). Jóllehet több *H. punctata* hímot gyűjtöttünk április végéig (73% hím, 15-ből 11 példány), mint az aktivitási periódus második felében (33% hím, 6-ből 2 példány), a kis mintaszám miatt ez nem volt szignifikáns különbség.

Összehasonlítva az élőhelyek három vizsgált típusát az egyes kullancsfajok aktivitásának időbeli különbségei szempontjából, megállapítható, hogy a száraz legelők mentén (I. típusú biotóp) az *I. ricinus* csúcsidezőszaka másfél hónappal követte a *Dermacentor*-fajokét, míg ez a különbség elmaradt a részben száraz vegetációjú erdei réteken (4.3.1.2. táblázat: II. típusú biotóp). Ez utóbbi élőhelyen a *H. inermis* maximális egyedszámát legalább egy hónappal a *H. concinna* aktivitási csúcsa előtt érte el, míg ez a különbség elmosódott a sűrű, zöld aljnövényzetű erdőkben (4.3.1.2. táblázat: III. típusú biotóp).

Megbeszélés

Hazánkban ez a növényzetről gyűjtött kullancsok tér- és időbeli eloszlásának első széleskörű vizsgálata. A jelen vizsgálat során a Magyarországon korábban leírt 20 kullancsfaj közül (Janisch, 1959) hatot sikerült megtalálni. További 12 előzőleg honosnak tekintett *Ixodes*-faj előfordulását nem tudtuk megerősíteni, de ezek legtöbbjét ritkának tekintik (Janisch, 1959), vagy emlős/madár gazdáik fészében fordulnak elő és onnan gyűjthetők (például vadon élő ragadozókon az *I. canisuga* faj, amely kutyákról is relatíve gyakran kerül elő: Földvári és Farkas, 2005). A mintavételi helyek számát figyelembe véve, ahol valamely faj megtalálta életfeltételeit, az *I. ricinus* számít a legelterjedtebb (ubikviter) hazai kullancsfajnak, amelyet sorrendben a *D. reticulatus*, a *D. marginatus* és a *H. concinna*

követ. Ez megfelel a Magyarországtól északabbra fekvő országokban megfigyeltnek (Rehácek és mtsai, 1991; Cornely és Schultz, 1992), de eltér a hazánktól délebbre található országok adataitól (Milutinovic és mtsai, 1996) leginkább a *Rhipicephalus sanguineus* hiánya miatt. Bár ezt a fajt korábban behurcolták Magyarországra (Hornok és Farkas, 2005), az ilyen sporadikus esetek valószínűleg nem vezettek következetesen megtelepedéséhez. Kutya kenneleken és emberi lakóhelyeken kívül a *R. sanguineus* leggyakrabban nyílt területeken gyűjthető, ahol ritka, száraz növényzet van (Estrada-Peña és mtsai, 1992). Mivel az ország déli határszélének egésze mentén végeztünk mintagyűjtést, a *R. sanguineus* és más mediterrán kullancsfajok hiánya azt jelentheti, hogy elterjedési területük várható északabbra tolódásának (Kampen, 2001) Magyarországon 2007-ben még nem voltak egyértelmű jelei, még a meteorológia történetének legenyhébb tele után sem (szemben pl. Svájc déli részével, ahol a *R. sanguineus* megtelepedéséről számoltak be: Bernasconi és mtsai, 2002). Hasonlóképpen, a 2007-es vizsgálat eredményei szerint az *I. ricinus* tavaszi csúcs aktivitását nem befolyásolta látványosan a meleg téli időjárás és ugyanúgy májusban következett be, mint a korábbi években (Széll és mtsai, 2006).

Jól ismert, hogy az *I. ricinus* és más *Ixodes*-fajok a nedvesebb (magas páratartalmú), erdei területeket részesítik előnyben az erdőktől mentes nyílt térségekhez képest (Gilot és Pérez-Eid, 1998; Uspensky, 2002; Lindstrom és Jaenson, 2003), amit vizsgálatunk eredményei is megerősítenek. Másfelől, a *D. marginatus* és a *D. reticulatus* nyílt térséget és szárazabb növényzetet kedvelő életmódja (Nosek, 1972; Estrada-Peña és mtsai, 1992; Uspensky, 2002) is megfigyelhető volt Magyarországon. E három fajt hazánk legmagasabb hegységében, egészen 900-1000 méteres tengerszint feletti magasságig megtaláltuk. Egy ezt megelőző közép-európai tanulmány szerint 850 méter felett csak az *I. ricinus* nymphái fordultak elő (Materna és mtsai, 2005), így 2007-es megfigyeléseink e faj adultjainak és a két *Dermacentor*-fajnak minden eddig ismertnél nagyobb magasságban való előfordulásáról tanúskodnak. Regionális eloszlásuk szerint pedig a *D. reticulatus* és a *D. marginatus* csaknem országszerte (kivéve délnyugaton) szimpatrikusnak tűnik.

Az egyetlen *Haemaphysalis*-faj, amit gazdáról (kutyáról és rókaról) gyűjtöttek a 2007-et megelőző években, a *H. concinna* volt (Földvári és Farkas, 2005; Széll és mtsai, 2006), jölehet korábban a *H. otophila* fajt (valid név: *H. parva*) is leírták nyúlról (Janisch, 1959), illetve a *H. punctata* fajt szarvasmarháról (Kotlán és mtsai, 1959). Babos (1965) a *H. imermis* fajt nemének Magyarországon legritkább képviselőjeként említi, de ez láthatóan megváltozott az elmúlt évtizedek során, mivel 2007-ben a legnagyobb összesített egyedszámban és az ország számos részében volt gyűjthető. A *H. inermis* és a *H. concinna* inkább a nedvesebb (páradúsabb) erdőkhöz társul (Nosek, 1971a), szemben a *Ha. punctata* fajjal, amely a szárazabb élőhelyeken fordul elő (Nosek, 1971b). Ez utóbbit jól példázzák a déli fekvésű lejtők akár mészköves (Mannelli és mtsai, 1997), akár vulkanikus kőzettel borított területen (mint a 2007-es hazai vizsgálat eredményei tükrözik).

A *H. concinna* és az *I. ricinus* adultjainak és nympháinak együttes előfordulása áprilisban arra utalhat, hogy e fejlődési stádiumokban telettek át, minthogy lárváik csak májustól jelentek meg. A mérsékelt éghajlati zónában az *I. ricinus* adultjai és nymphái egész évben jelen lehetnek a vegetáción (Walker, 2001), a *H. concinna* esetében pedig ezek áprilistól aktívak (Nosek, 1971a). Ezzel szemben a *D. marginatus* és a *D. reticulatus* adultok (hideg tél esetén márciustól folytatva a gazdakeresést a vegetáción) négy hónappal megelőzik a nymphákat, amelyek ráadásul kedvelt gazdaállataik (például rágcsálók) búvóhelyén tartózkodnak („fészeklakók”) (Nosek, 1972). A *H. inermis* lárvák/nymphák pedig a természetben ritkán találhatóak, mivel a növényzet gyűjtéskor nehezen hozzáférhető részein tartózkodnak huzamosabb ideig és röviden táplálkoznak (Babos, 1965; Hoogstraal, 1969). Mindez nagyrészt megmagyarázza, hogy miért nem találtunk lárvákat és nymphákat e három fajból.

Ami a hímek és nőstények számát illeti, bár a kullancsok ivararánya minden utódnemzedékben általában 1:1 körüli, a különböző ivarú kullancsok jelenléte a vegetáción (ahonnan a gyűjtés történik) nagyfokú változatosságot mutathat (Fourie és mtsai, 1996). Ezt leginkább a párosodási stratégia befolyásolhatja. Mivel a Prostriata csoport képviselői (*Ixodes*-fajok) akár a növényzeten, akár a gazdán párosodhatnak, a hímek gyakran nem folytatnak gazdakeresést, és így kevésbé gyűjthetők a "dragging-flagging" módszerrel (ami egyúttal megmagyarázza a nőstények magas számát a parazitikus populációban: Fourie és mtsai, 1996). Másfelől a Metastrata kullancsok, például a *Dermacentor*-fajok, kizárólag a gazdán párosodnak (Kiszewski és mtsai, 2001), aminek következtében a növényzeten a

tavaszi aktivitás során rendszerint a nőstények száma magas (Nosek, 1972), mert a hímek hamarabb jutnak fel a gazdára, hogy minél több nősténnyel párosodjanak (Oliver, 1989). Ez magyarázhatja, hogy a populáció gazdakereső tagjai között miért volt magasabb a nőstények, mint a hímek aránya mind az *I. ricinus*, mind a *Dermacentor*-fajok esetében, ahogy ezt mások is megfigyelték (Milutinovic és mtsai, 1996). Az ivararányt befolyásolhatja még a hímek és nőstények eltérő ellenálló-képessége kedvezőtlen környezeti viszonyok esetén (ami a klímaváltozással összefüggésben is bekövetkezhet). Például, a *D. reticulatus* nőstények jobban tűrik a kiszáradást, mint a hímek, míg a *D. marginatus* fajnál a hímek ellenállóbbak a nőstényeknél (Meyer-König és mtsai, 2001), ami fontos tényező lehet annak hátterében, hogy a *D. reticulatus* (mint a hazai vizsgálat során) gyakran jellemezhető a nőstények magasabb arányával a *D. marginatus* fajhoz képest (Nosek, 1972). Ezekon kívül a fejlődési stádiumok nyugalmi állapota is befolyásolhatja az utódnemzedék ivararányát: azon nymphák között, amelyek nyugalmi állapotban estek át (és nem közvetlenül fejlődtek adulttá), hím dominanciát figyeltek meg (Fourie és mtsai, 1996). Ez a *H. concinna* fajra vonatkozhat, mivel a vizsgálatban összességét tekintve későbbi aktivitást mutatott a többi fajhoz képest, a hímek egyidejű túlsúlyával (bár ez függött az élőhely típusától is).

A kullancsok szezonális aktivitása, beleértve aktivitási csúcsukat, nagy mértékben függ olyan környezeti hatásoktól, amelyek élőhelyükre jellemzőek; ilyen tényezők a makro- és mikroklíma, a vegetáció típusa és a gazdák jelenléte (Randolph, 2004; Gilot és Pérez-Eid, 1998). Ha a körülmények nem teszik lehetővé táplálkozásukat és fejlődésüket, a kullancsok meghosszabbíthatják anabiotikus periódusukat és később jutnak ki nyugalmi állapotukból (Belozarov, 1982), amivel összefüggő biotóp típusától függő, fajon belül időben eltérő/eltolódott aktivitási csúcsuk. Ezt a 2007-es hazai vizsgálat megfigyelései is megerősítik, mivel a hőmérsékletfüggő fejlődési sebesség okozhatta a *Dermacentor*-fajok mint nyílt térséget kedvelő kullancsok (Uspensky, 2002) későbbi aktivitási csúcsát a hegyi rétek hidegebb körülményei között a melegebb, száraz legelőkhez képest. Egy másik tényező, ami legelői környezetben a *Dermacentor*-fajok korábbi aktivitását előmozdíthatja, az a háziállatok mint gazdák e biotóp típusra jellemző szabályszerű és "biztosított" jelenléte kora tavasztól (a legeltetési idény kezdetétől), szemben a vadak hegyi élőhelyeken való véletlenszerű felbukkanásával.

Az ún. erdei kullancsok csoportjában a *Haemaphysalis*- és különösen az *Ixodes*-fajok jobban fejlődnek olyan helyen, ami magasabb nedvességtartalmat kínál (Uspensky, 2002), ahogy ez a sűrű, zöld növényzetű erdei ösvények mentén jellemző, és lassabban a hegyi rétek szélén előfordul, részben száraz növényzet alatt. Az is megfigyelhető volt, hogy mindhárom *Haemaphysalis*-faj (Nosek, 1971a, 1971b; Pérez-Eid és mtsai, 1993), de még az *Ixodes* és a *Dermacentor* nemek képviselői is nagyobb egyedszámban fordultak elő tölgyfás élőhelyeken, az irodalmi adatoknak megfelelően (Nosek, 1972; Minar, 1992), ami szintén a potenciális gazdák jelenlétéhez kapcsolódik a vonatkozó területeken (Randolph, 1998). Ugyanígy, a gazdakereső adult kullancsok felhalmozódhatnak ösvények, vadcsapások mentén (Burg, 2001), amint ezt 2007-es vizsgálatunk során az *I. ricinus* legmagasabb példányszáma tükrözte széles, erdei ösvények mentén.

A 2007-es vizsgálat eredményei először mutattak rá, hogy a *H. inermis* hazánkban nagyon gyakori, és azt is sugallták, hogy a *H. punctata* egyedszáma lecsökkent (vagy e faj néhol el is tűnhetett) Észak-Magyarországon ismert korábbi élőhelyein (Janisch, 1959), ahol a juh volt az elsődleges gazdája (Babos, 1965). Ezt a következtetést az is alátámasztja, hogy a *H. punctata* fajt előzőleg nem sikerült megtalálni hazánk ugyanezen északi részén ugyanebben a periódusban (Hornok és mtsai, 2007a). Ezek a változások és az *I. ricinus*, valamint a két *Dermacentor*-faj 900 méter feletti magasságban való előfordulása (amit Közép-Európában még nem figyeltek meg) köze lehet a Magyarországon 30 év alatt > 1°C-kal megnőtt éves középhőmérséklethez (Országos Meteorológiai Szolgálat adatai), illetve kis mértékben az enyhe télhez is (van Oldenborgh, 2007).

A klimatikus tényezők (az egyedszám, szezonális aktivitás befolyásolása mellett) hozzájárulhatnak a kullancsfajok gazdaváltásához is, ahogy ezt az *I. ricinus* esetében leírták, mivel Olaszországban a nyílt térségben legelő juhokról (amelyekkel korábban jellemzően társult) preferenciájában áttért az erdőlakó vadon élő kérődzőkre (Genchi és Manfredi, 1999). A növényzeten és a nedvességtartalom túlmenően ez is hozzájárulhatott, hogy a hazai felmérésben e faj legnagyobb egyedszámban hegyi erdők ösvényein fordult elő, és kevésbé rétek mentén vagy legelők peremén.

Arról is született már elmélet, hogy az adott helyen korábban bizonyíthatóan előfordult nagyszámú kullancsfaj közül csak néhány, erős alkalmazkodóképességű fog végül elterjedni, és így néhány ellenállóbb faj fokozatosan háttérbe szoríthatja a többi (Genchi és Manfredi, 1999). A 2007-es országos vizsgálat is ezt a tendenciát tükrözi, mivel ennek során csak hatot találtunk meg a Magyarországon korábban, mintegy 50 éve honosként leírt 20 kullancsfajból (Janisch, 1959) (más, korábban említett okok mellett).

A fenti eredmények értelmében fontos, hogy a kullancsfajok idő- és térbeli eloszlásának változásait figyelemmel kísérjük, és közben számításba vegyük az élőhelyek közötti különbségeket. Ezáltal lehetővé válik, hogy felmérjük a globális felmelegedés és az enyhébb telek (amennyiben állandósulnak) vonatkozó hosszú távú hatását. Arra a következtetésre is juthatunk, hogy bár a gazdáról gyűjtött kullancsok adatai hasznos információval szolgálnak a fajok diverzitásáról és a fertőzőtség intenzitásáról, de a kullancsfajok aktivitási csúcsát csak összességében tükrözik. Ahhoz, hogy a kórokozók kullancs általi közvetítésének valódi, helyi kockázatát megítélhessük, a kullancsokat a növényzetről célszerű gyűjteni, mégpedig a helyi példányszámot a különféle élőhelyek függvényében mérlegelve.

4.3.2. A hazánkban előforduló fontosabb kullancsfajok szezonálisitása

Előzmények

Korábbi hazai felmérésünkben a tavaszi kullancs aktivitás idején végeztük a gyűjtést (4.3.1. fejezet), így nem volt alkalmunk a legfontosabb kullancsfajok éves szezonális aktivitását összehasonlítani. Ezért 2008-ban úgy gyűjtöttem kullancsokat a növényzetről Észak-, Északkelet-Magyarország három megyéjében (Pest, Nógrád és Borsod), hogy (a) az felölelje a teljes aktivitási periódust, és (b) figyelembe vegye az élőhelyek közötti különbségeket (tehát mindhárom fő élőhely típus három-három hellyel képviselte magát).

Eredmények

Ennek vizsgálatához 1479 adult kullancsot gyűjtöttem. Közülük az *Ixodes ricinus* bizonyult a leggyakoribb fajnak, 676 példánnyal. A növényzetről gyűjtött példányok alapján ennél az egy fajnál figyeltem meg gazdakereső magatartást az év minden hónapjában. Magasabb tavaszi és alacsonyabb őszi aktivitást mutatott, májusi illetve szeptemberi csúccsal (4.3.2.1.a ábra). E faj nymphái az év nagy részében jelen voltak a növényzeten (4.3.2.1.a ábra), de ősszel kisebb számban (nem közölt adat).

A *Dermacentor marginatus* fajból összesen 153 példányt gyűjtöttem. E faj esetében a legmagasabb szintű aktivitást tavasszal mértem, februári-márciusi csúccsal, amit jelentősen kisebb őszi aktivitás követett (4.3.2.1.b ábra). Nymphea aktivitást a tavaszi gazdakereső magatartás végén figyeltem meg. Ezzel szemben, bár a *D. reticulatus* jelenlétét tavasszal is kimutattam a vegetáción, ez sokkal nagyobb mértékű volt ősszel (4.3.2.1.c ábra), összesen 260 példány alapján.

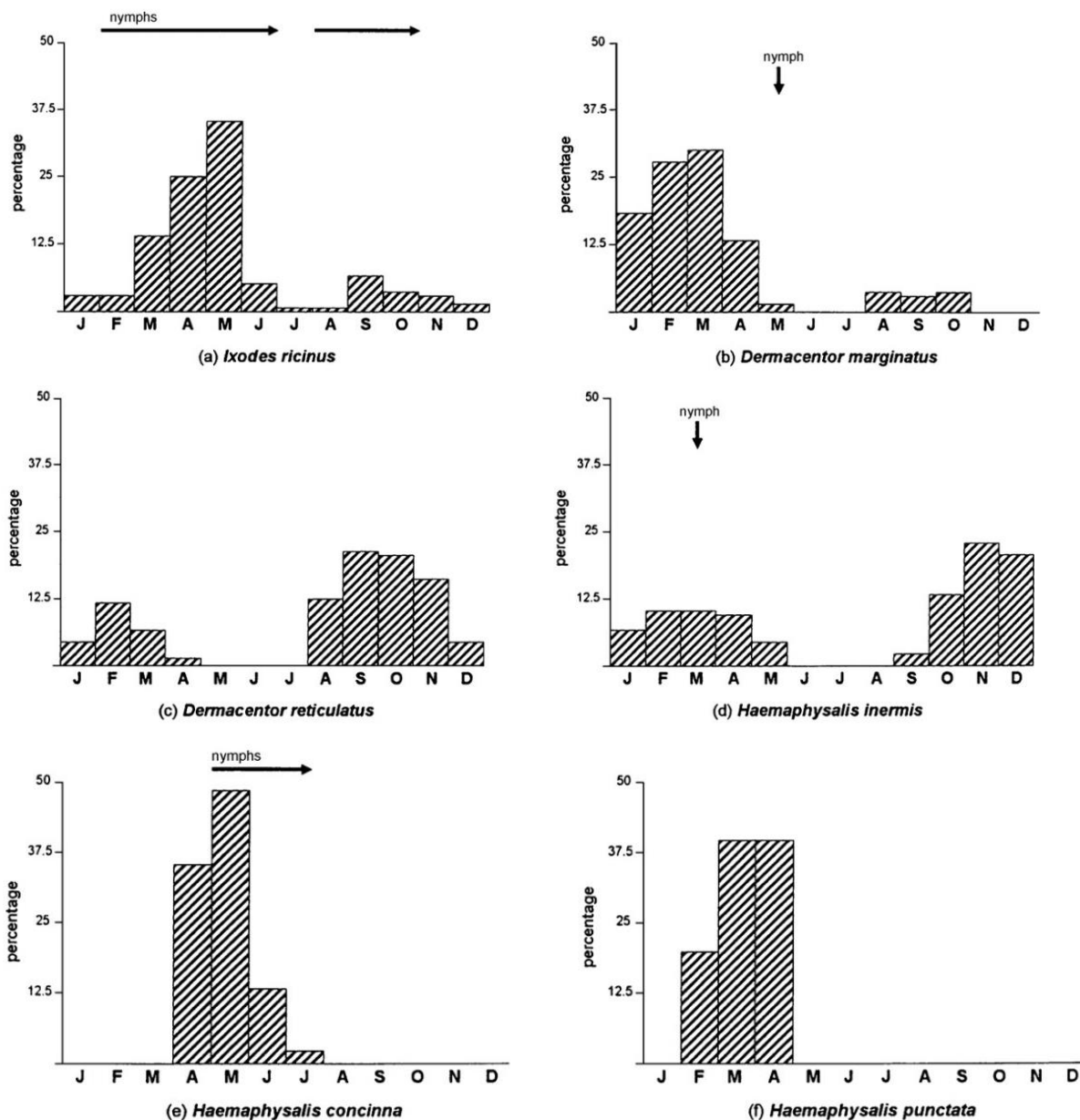
A *Haemaphysalis* nemből leggyakrabban a *H. inermis* fajt gyűjtöttem, összesen 326 példányt. E faj aktivitása alacsonyabb volt tavasszal és magasabb ősszel (4.3.2.1.d ábra), amely utóbbi csúcsa novemberre és decemberre esett. Nymphea aktivitást a tavaszi időszak közepén tapasztaltam (4.3.2.1.d ábra). A téli hónapokban a *H. inermis* 4 °C felett aktív volt.

A *H. concinna* fajból 54, a *H. punctata* fajból pedig 10 példányt gyűjtöttem. Az előbbi monofázisos, késő tavaszi aktivitást mutatott, az adult és nymphea stádiumú kullancsoknak a növényzeten megfigyelt, egyidejű jelenlétével (4.3.2.1.e ábra); míg a *H. punctata* adultok gazdakereső aktivitását kora tavasszal, februártól tapasztaltam (4.3.2.1.f ábra).

A fenti eredmények értelmében mind a *Dermacentor*, mind a *Haemaphysalis* nemen belül az egyes fajok időben eltolódott, egymás melletti (ún. allokrónikus) szezonálisitást mutattak.

Az ivararány szempontjából elmondható, hogy a gazdakereső populáció az év egészében a nőstények túlsúlyával jellemezhető (nem közölt adatok), kivéve a *H. concinna* (29 hím és 25 nőstény) és a *H. punctata* (5 hím és 5 nőstény) fajokat. Az eredményeket azonos nemzedék, tehát őszi-tavaszi periódus szerint értelmezve a gazdakereső hímek aránya (bár nem szignifikánsan, de) magasabb volt

ősszel, mint tavasszal három kullancsfaj esetében, a következő aránypárok alapján: *D. marginatus* 50% (14-ből 7) vs. 38,1% (139-ből 53), *D. reticulatus* 42,3% (194-ből 82) vs. 33,3% (66-ből 22), és *H. inermis* 36% (189-ből 68) vs. 30,7% (137-ből 42). Ezekkel szemben, az *I. ricinus* esetében a gazdakereső hímek aránya alacsonyabb volt ősszel (40,6%: 96-ből 39), mint tavasszal (47,9%: 580-ből 278).



4.3.2.1. ábra. A kullancsok arányának százalékos megoszlása az egyes hónapokban (alsó tengelyen kezdőbetűvel rövidítve). A függőleges tengelyen a gyűjtési helyek összesített havi kullancs mennyisége szerepel az adott fajra vonatkozó éves összesítés százalékaként ("percentage"). A nymphek ("nymphs") megjelenését az adott hónaptól jobbra mutató nyíl jelzi.

Megbeszélés

Ebben a vizsgálatban az adatokat élőhely típusonként gyűjtöttem havonta egy éven keresztül, majd összesítettem. Az eredményekből kiderült, hogy az *I. ricinus* magasabb tavaszi és alacsonyabb őszi aktivitást mutatott, aminek májusi és szeptemberi csúcsa összhangban van korábbi, hazai megfigyelésekkel (Széll és mtsai, 2006; 4.3.1. fejezet). A két *Dermacentor*-faj aktivitási periódusa különbözött egymástól: a *D. marginatus* esetében tavaszi, a *D. reticulatus* esetében magasabb őszi csúccsal. Ez az

eltérés megnyilvánul a két *Derma-centor*-faj által közvetített kórokozók okozta kórképek ismert szezonális különbségeiben is. Nevezetesen, a kutya babesiosisának klinikai estei (a *D. reticulatus* aktivitásának következményeként) kétfázisú, tavaszi és őszi csúccsal jellemezhetőek (Csikós és mtsai, 2001), szemben a ló babesiosis (Buza és mtsai, 1953) és a juh anaplasmosis (Hornok és mtsai, 2007a) tavaszi, kora nyári jelentkezésével, amely esetben a *D. marginatus* domináns vektor szerepe feltételezhető.

Figyelembe véve, hogy hazánkban a *Haemaphysalis* nem képviselői közül korábban a *H. inermis* fajt tartották a legritkébbnek (Babos, 1965), jelen vizsgálatomban viszont a leggyakoribbnak bizonyult, a *H. inermis* növekvő jelentőségű ("emerging") fajnak tekinthető. A *H. concinna* monofázisos aktivitása, amit jelen esetben megfigyeltem, Közép-Európában jól dokumentált (Nosek, 1971a; Széll és mtsai, 2006). Ezzel szemben hazánktól északra a *H. punctata* kétfázisú aktivitását írták le, márciustól júniusig illetve októberben (Nosek, 1971b), ami nem egyezik az általam tapasztaltakkal. Minthogy azonban e fajt a gyűjtési helyeken eleve kis egyedszám képviselte – valószínűleg azzal összefüggésben, hogy hazánkban a korábbi évekhez képest ritkébbá vált (4.3.1. fejezet) – más élőhelyeken egy kora őszi aktivitás (illetve csúcs) nem zárható ki teljesen.

Összességében, az adult kullancsok ivararányában a szezonális felmérésekor tapasztalt tendenciák (nőstények túlsúlya, kivéve a *H. concinna* és a *H. punctata* fajokat) összhangban vannak más, korábbi megfigyeléseinkkel (4.3.1. fejezet).

Azon fajok esetében, amelyek növényzetről való gyűjthetőségük értelmében az év mindkét felében gazdakereső magatartást mutatnak (azaz júliustól decemberig éppúgy, mint januártól júniusig), az őszi populációban jelenlévő adultok többsége ugyanazt az éves generációt képviseli, amely (áttelelése után) a következő tavasszal folytatja gazdakereső aktivitását (Nosek, 1972; Randolph és mtsai, 2002). Az eredményeket azonos nemzedék, tehát őszi-tavaszi periódus szerint értelmezve a gazdakereső hímek aránya a legtöbb kullancsfaj esetében magasabb volt ősszel, mint tavasszal, kivéve az *I. ricinus* fajt. A kullancsok gazdakereső populációjában megfigyelhető ivararányt leginkább a párosodási stratégia befolyásolja. A Prostriata csoportba tartozó *Ixodes*-fajok a növényzeten is párosodnak (Kiszewski és mtsai, 2001), és ennek következtében a hímek gyakorta nem is folytatnak gazdakereső magatartást, szemben a Metastrata kategóriát képviselő *Derma-centor*- és *Haemaphysalis*-fajokkal. Ennek értelmében tehát a hímek őszi-tavaszi arányában megfigyelt ellenkező tendencia (Metastrata: ősszel több hím, Prostriata: tavasszal több hím) azt tükrözheti, hogy az ez utóbbi csoportba tartozó *I. ricinus* esetében a szóban forgó periódusban egyre több hím folytat gazdakeresést, mivel valószínűleg kimerülő tartaléktápanyaguk arra ösztönzi őket, hogy a gazdákön termékenyítsenek meg nőstényeket, ahol erre nagyobb az esély (Randolph és mtsai, 2002).

Érdekes következtetésekkel szolgálhat, ha összevetjük az egyes kullancsfajoknak általunk, 2008-ban megfigyelt szezonálisitását a korábbi évek széleskörű gyűjtésekből származó (különbéle biotópokat egyszerre képviselő vagy összesítő) adataival (Nosek, 1972; Széll és mtsai, 2006; 2007-es gyűjtés: 4.3.1. fejezet). Ez utóbbi források korábbi évekből közölt adataihoz képest 2008-ban a *Derma-centor*-fajok aktivitási csúcsa körülbelül 1-2 hónappal korábbra tolódott. Hasonlóképpen, a *H. inermis* kullancsfaj 2008 első felében február-márciusi fő aktivitást mutatott, a 2007-ben leírt április-májusi helyett (4.3.1. fejezet), és a *H. punctata* szintén egy hónappal hamarabb érte el aktivitási csúcsát 2008-ban, mint korábban (Nosek, 1971b; 4.3.1. fejezet). E négy kullancsfajjal szemben az a kettő, amelyik későbbi csúcsidőszakkal jellemezhető, nem vagy alig mutatott eltérést szezonálisában. Nevezetesen, a *H. concinna* aktivitása 2008-ban májusban érte el maximumát, 2007-hez hasonlóan (4.3.1. fejezet), de egy hónappal hamarabb a még korábbi évekhez képest (Nosek, 1971a; Széll és mtsai, 2006). Régebbi, hasonló éves periódusban végzett gyűjtések szerint az *I. ricinus* adultok is mindig májusban voltak legaktívabbak (Széll és mtsai, 2006; 4.3.1. fejezet), hasonlóan a 2008-as vizsgálathoz. Ugyanígy, az év még későbbi periódusában növekvő kullancsaktivitás – amit a *D. reticulatus* őszi (szeptember-októberi) csúcsa példáz – nem mutatott jelentős eltérést 2008-ban a korábbi évekhez képest (Nosek, 1972; Széll és mtsai, 2006).

Ezek az adatok megerősítik, hogy a téli időjárás leginkább bizonyos kullancsfajok nyugalmi állapotának végét befolyásolja, mégpedig elsősorban azon kullancsfajokét, amelyek adultként a kora tavaszi populációban vannak jelen (Randolph, 2008). Az eredmények azt is sugallják, hogy (a téli

hőmérséklet eredményeként) a *Dermacentor* és *Haemaphysalis* nemek két-két fájának szezonálisitása (amit a korábbra tolódott tavaszi csúcsaktivitás tükröz) markánsabban változott 2008-ban 2007-hez képest. Ennek értelmezéséhez figyelembe kell venni, hogy 2006/2007 tele a meteorológiai adatrögzítés történetében a legenyhébb volt (van Oldenborgh, 2007). Ezzel szemben, 2008 január és február hónapja összességében nem volt enyhe, viszont mindkét hónapban bekövetkezett egy-egy hirtelen hőmérsékletnövekedés (az utóbbi esetében 8 nap alatt 16 °C-kal nőtt a napi középhőmérséklet, és a hazai meteorológia történetében azon a napon mért legmagasabb hőmérséklethez vezetett: az Országos Meteorológiai Szolgálat adatai szerint a február 17.-én mért -17.3 °C minimumról február 25.-re 21 °C maximum lett). Így arra a következtetésre juthatunk, hogy egy folyamatosan enyhe télhez képest az egymást követő téli napokon hirtelen megnövekvő hőmérsékletnek fontosabb szerepe lehet a kullancsok téli nyugalmának korábbi befejeződésében és így a gazdakereső aktivitás folytatásának kiváltásában. E jelenség ellenkezőjét már leírták, mivel ismert, hogy a hirtelen zuhanó őszi hőmérséklet nagyobb számú *I. ricinus* fejlődési alak aktivitásának felfüggesztését (tehát nyugalmi állapotba kerülését) vonta maga után (Randolph és mtsai, 2000). Ily módon jelen vizsgálatom eredményei arra utalnak, hogy a kullancsok adott évi szezonális aktivitására a szélsőséges időjárási viszonyok (amilyen a hirtelen hőmérsékletváltozás) nagyobb hatással vannak, mint a lassú (globális) felmelegedés illetve enyhülés. Ugyanakkor ez utóbbi a kullancsfajok földrajzi elterjedtségének változásában, tehát például melegkedvelő fajok északabbra történő meghonosodásában, áttelelési képességében játszhat fontosabb szerepet (Hartelt és mtsai, 2008; 4.6.7. fejezet). Mindezt érdemes figyelembe venni a kullancsok jelenlétének – és ezzel összefüggésben kórokozó közvetítő szerepük állat- és humán egészségügyi kockázatainak – felméréséhez.

Ha összehasonlítjuk az egy nembe tartozó kullancsfajokat aktivitási csúcsuk szerint, a jelen felmérésben allokrónikuságot (időbeli eltolódást, elválasztottságot, "egymásmellettséget") figyelhetünk meg a két *Dermacentor*-faj szezonálisitása között (tavaszi vs. őszi dominancia) éppúgy, mint a három *Haemaphysalis*-faj esetében (kora tavaszi, késő tavaszi illetve késő őszi csúcs). Minthogy a szóban forgó fajok gyakran szimpatikusak (4.3.1. fejezet), és gazdaspektrumuk hasonló vagy legalábbis átfedő (Babos, 1965), feltételezhetjük, hogy e szezonálisbeli különbség – mint a reprodukciós izoláció ökológiai mechanizmusa – szerepet játszhatott e nemeken belül a több irányú evolúcióban (fajképződésben: speciációban). A *Dermacentor*-fajok reproduktív izolációjára molekuláris vizsgálatok és keresztezési kísérletek is szolgáltatnak bizonyítékot (Zahler és Gothe, 1997). Úgy tűnik azonban, hogy e kullancsoknál a szezonális eltolódását mint a korábban egységes populációk tagjainak más-más irányú fejlődését előmozdító tényezőt figyelmen kívül hagyták. Másfelől ismert, hogy az aktivitás évszakos különbségei szerepet játszanak a paraziták fajképződésében (Huyse és mtsai, 2005) és ezt más ízeltlábú csoportoknál le is írták (Santos és mtsai, 2007). Ez az egyenlőtlen időbeli eloszlás a kullancsok gazda specializációja során is szelekciós előnnyel járhat (McCoy és mtsai, 2005), különösen a *Metastriata* csoport fajainál, hogy elkerüljék a kis helyen (gazdán, párosodás közben) való egyidejű parazitizmust. Következésképpen, minthogy a hazai *Dermacentor*- és *Haemaphysalis*-fajok szimpatikusak (gyakran fordulnak elő egyazon élőhelyen vagy akár gazdán), azaz földrajzi/fizikai elkülönülés hiányában a szóban forgó kullancsfajok aktivitási periódusának fent megfigyelt időbeli eltérése (vagyis különböző szezonálisitásuk) egyfajta "allokrónikus speciáció" alapjaként szerepet játszhatott evolúciójukban.

4.3.3. Városi élőhelyek hatása a kullancsfajok előfordulására, szezonálisitására

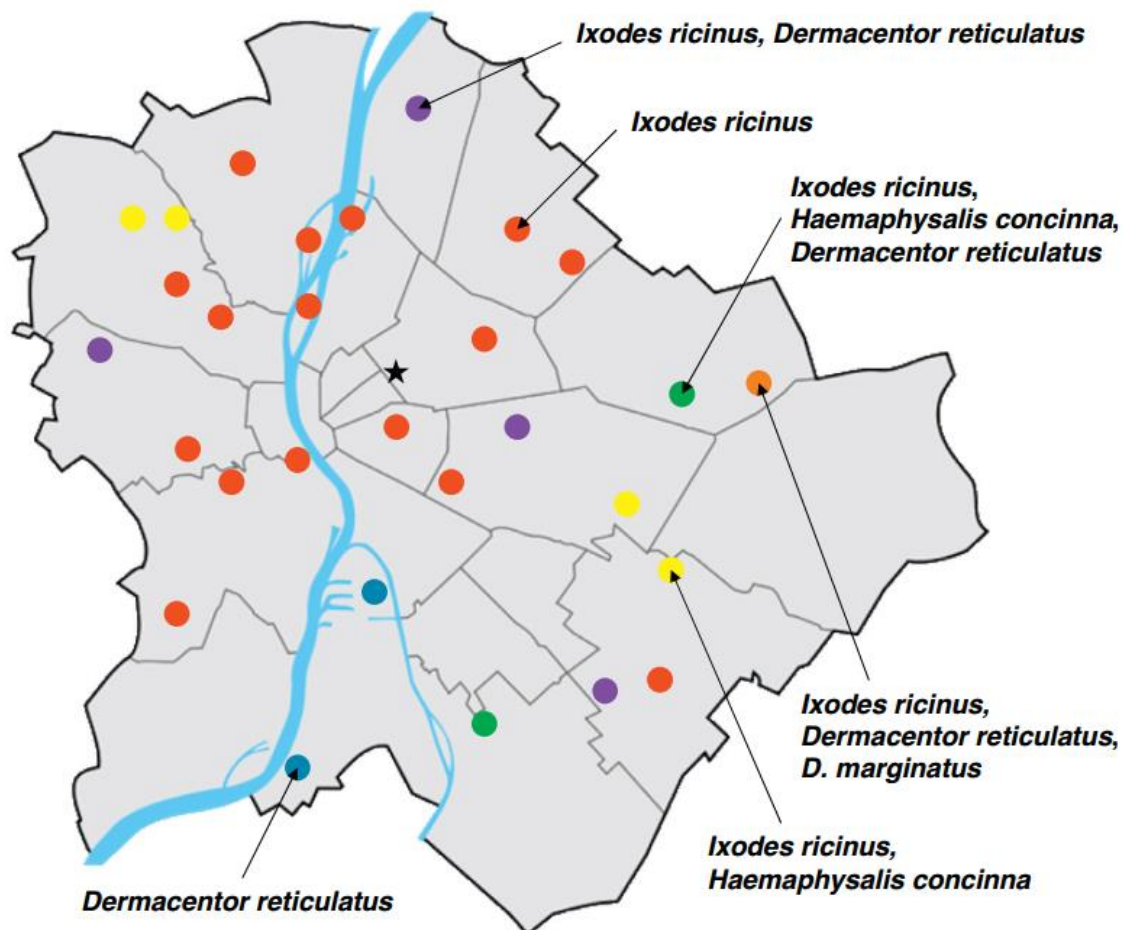
Előzmények

A városi élőhelyek egyfelől előnyökkel is járhatnak a kullancsok számára, mivel – a szélesebb gazdaspektrumú fajok – akár emberre, akár (házi és vadon élő) állatokra felkapaszkodhatnak. Ugyanakkor az alkalmas élőhelyek eloszlása nem folytonos, mint a természetes környezetben, hanem töredezett (mozaikszerű), ami hátrányt jelent a városokban élő kullancsfajok számára gazdán kívüli periódusuk szempontjából (Dautel és Kahl, 1999). Hazánkban eddig nem volt széleskörű kullancsfelmérés a

legnagyobb városban, Budapesten, amely átfogó információt nyújthatott volna az ott előforduló fajokról. Célunk e hiányzó adatok pótlása volt, különféle városi kullancs élőhelyek összehasonlításával.

Eredmények

A 2013-as vizsgálat során városi élőhelyeken (erdőkben, parkokban és temetőekben) összesen 2455 kullancsot gyűjtöttünk, amelyek négy fajba tartoztak. A 30 gyűjtési hely közül (4.3.3.1. ábra) mindössze egy parkban nem találtunk kullancsokat (itt a növényzetet ápolták, a fűvet rendszerint nyírták).



4.3.3.1. ábra. Budapest térképe a mintavételi helyekkel. A színek következtében jelöli azonos színnel azokat a helyeket, ahol ugyanazok a kullancsfajok fordultak elő. A csillag jelöli azt a parkot (Városliget), ahol nem volt eredményes a kullancsgyűjtés.

A városi élőhelyeken leggyakoribb kullancsfajnak az *Ixodes ricinus* bizonyult, 78,6%-os abundanciával (706 hím, 621 nőstény, 494 nympa és 108 lárva: a 2455 kullancsból 1929 példány, CI: 76,9-80,2%). A 29 kullancs élőhely közül 27 esetében sikerült ezt a fajt megtalálni (4.3.3.1. ábra és 4.3.3.1. táblázat). A négy, városi környezetben gyűjtött kullancsfajt figyelembe véve az *I. ricinus* élőhelyei voltak a legközelebb a városközponthoz (1 km-en belül is). Tizenhat gyűjtési helyen csak *I. ricinus* fordult elő, és az 5 temető közül négyben csak ezt a kullancsfajt sikerült megtalálni (4.3.3.1. táblázat).

A *Haemaphysalis concinna* abundanciája 17,8% volt (9 hím, 7 nőstény, 23 nympa és 398 lárva: a 2455 kullancsból 437 egyed, CI: 16,3-19,3%). E fajt a 29 kullancs élőhely közül 6 esetében találtuk meg (4.3.3.1. ábra és 4.3.3.1. táblázat). Az *I. ricinus* fajhoz hasonlóan, a *H. concinna* is előfordult mindhárom élőhely típusban.

A harmadik leggyakoribb kullancsfaj, a *Dermacentor reticulatus* abundanciája 3,6% volt (33 hím, 55 nőstény: a 2455-ből 88 példány, CI: 2,9-4,4%). Annak ellenére, hogy jelenléte két élőhely típusra korlátozódott (parkok és erdők: 4.3.3.1. táblázat), kilenc élőhelyével elterjedtebbnek tűnt, mint a *H. concinna*. A negyedik azonosított faj, a *D. marginatus* képviselője egyetlen nőstény volt, egy olyan erdőből, ahol a közelben szarvasmarhát és lovat tartottak (4.3.3.1. ábra és 4.3.3.1. táblázat).

Leggyakrabban az *I. ricinus* és a *D. reticulatus* fordult elő együtt (hét helyen), amit sorrendben az *I. ricinus* és a *H. concinna* együttes jelenléte követett hat helyen. E három faj azonos élőhelyen is megtalálható volt (két parkban).

Áprilistól júniusig az *I. ricinus* élőhelyenként összesített átlagos egyedsűrűsége a parkok és erdők között kiegyenlített volt, míg temetőkből április hónapban szignifikánsan ($P = 0,047$) magasabb volt a parkokhoz képest, és júniusban is a parkokhoz ($P = 0,026$) és az erdőkhöz ($P = 0,032$) képest (4.3.3.1. táblázat).

4.3.3.1. táblázat. A három városi élőhely típus összehasonlítása a jelenlévő kullancsfajok és az *Ixodes ricinus* egyedsűrűsége szempontjából. Az egy oszlopban azonos felső betűvel jelölt számok szignifikánsan nem különböznek.

Élőhely típus ¹	Érintett élőhelyek száma /összes			<i>I. ricinus</i> egyedszám / 300 m ²			
	<i>I. ricinus</i>	<i>D. reticulatus</i>	<i>D. marginatus</i>	<i>H. concinna</i>	Április	Május	Június
Temető	5/5	0/5	1/5		119 ± 74 ^a	126 ± 81 ^a	155 ± 94 ^a
Park	11/12	4/12	2/12		35 ± 21 ^b	51 ± 43 ^a	19 ± 14 ^b
Erdő	11/13	5/13 (1/13)	3/13		43 ± 25 ^{a, b}	52 ± 19 ^a	18 ± 8 ^b

¹A havonta vizsgált élőhelyek koordinátái:

Temetők (n = 3): 47°29'38.8" N/19°5'24.4"E; 47°28'20" N/19°11'3.9"E.

Parkok (n = 5): 47°33'29.9"N/19°4'14.9"E; 47°25'36.4"N/19°11'13.4"E; 47°24'37.1"N/19°7'30.8"E; 47°28'39.7"N/19°6'14.5"E; 47°29'23"N/19°2'32.7"E.

Erdők (n = 4): 47°31'5"N/18°57'30"E; 47°30'26.4"N/19°14'34.9"E; 47°32'14.4"N/18°59'44"E; 47°33'30.1"N/ 18°58'44"E.

Megbeszélés

A 2013-as vizsgálat során a vegetációról négy kullancsfajt (*I. ricinus*, *H. concinna*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*) sikerült gyűjteni Budapesten. Az *I. ricinus* és a *H. concinna* széleskörű elterjedtsége (tehát, hogy minden élőhely típusban előfordultak) jellemző gazdáik (kis emlősök, madarak: Nosek, 1971a; Hillyard, 1996; Hornok és mtsai, 2013a) ubikviter jelenlétével állhat összefüggésben. A *D. reticulatus* városi élőhelyeken való előfordulása (urbanizációja) ismert, mivel ez a kedvencként tartott kutyákról gyűjthető leggyakoribb kullancsfaj (Földvári and Farkas, 2005). Másfelől, a kutyáknak és nagyvadaknak mint e kullancsfaj adult hordozó (reprodukciónak) gazdáinak (Nosek, 1972) hiánya temetői környezetben megmagyarázhatja e kullancsfaj hiányát ezen élőhely típusból. A vizsgálat eredményei arra is rámutattak, hogy még a *D. marginatus* is megtalálható nagy városokban, ha kedvelt gazdafajai (szarvasmarha és ló) a közelben jelen vannak. Mindazonáltal ez utóbbi kullancsfaj járványtani jelentősége erősen urbanizált területeken alacsonynak tűnik.

A fenti kullancsfajok mindegyike szívhat vért emberen és vektora fontos (zoonótikus) kórokozónak (Estrada-Peña and Jongejan, 1999). Az *I. ricinus* ismert arról, hogy a kórokozók legszélesebb körét képes átvinni emberre, többek között a kullancs közvetítette encephalitis vírusát, a borreliákat (*Borrelia burgdorferi* s.l.), rickettsiákat (*Rickettsia helvetica*, *R. monacensis*), továbbá az *Anaplasma phagocytophilum*, a *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* és a *Babesia divergens* fajokat (Dantas-Torres

és mtsai, 2012). A *H. concinna* pedig (egyebek mellett) vektor lehet a *Francisella tularensis*; a *D. reticulatus* a *Ba. canis*; valamint mindkét *Dermacentor*-faj a *R. slovacca* és a *R. raoultii* esetében (Dantas-Torres et al., 2012).

Mivel az *I. ricinus* az emberen vért szívó legfontosabb és legelterjedtebb európai kullancsfaj (Gray, 1991), a kullancsokkal és kullancs közvetítette kórokozókval való fertőződés járványtani kockázatának felmérései leggyakrabban e kullancsfaj egyedsűrűségének és helyi ökológiájának megfigyelésére összpontosulnak. A 2013-as budapesti vizsgálatban a gazdakereső *I. ricinus* példányok legnagyobb egyedsűrűségüket a temetők elhanyagolt vagy használaton kívüli részeiben érték el. Mivel ezeken az élőhelyeken gazdakereső lárvák is voltak a növényzeten, ez a magas egyedszám leginkább helyi *I. ricinus* populációknak tulajdonítható. E kullancsok élelciklusához ubikviter kis emlősök minden bizonnyal előfordulnak a temetőekben (amint erre a rágcsálók bolhafaja, a *Nosopsyllus fasciatus* ottani előfordulása is utalt), és ezek alkalmasak arra, hogy a lárvákat, nymphákat fenntartsák. Városi környezetben az *I. ricinus* egyedszámát korlátozó legfontosabb biotikus tényező a közepes és nagy emlősök mint az adultok (reprodukciós) gazdáinak jelenléte (Dautel és Kahl, 1999; Uspensky, 2014). Minthogy nincsenek kutyák és nagyvadak a temetőekben, és a rágcsálók rendszerint nem szolgálnak az *I. ricinus* adultjainak gazdáiként (Rigó és mtsai, 2011), más kis emlősfajoknak kellett kompenzálnia a nagyobbak hiányát (Dautel és Kahl, 1999). Ennek megfelelően ismert, hogy a sünök akár jelentős számban is hordozhatnak *I. ricinus* adultokat (Földvári és mtsai, 2011), így e kullancsfaj fejlődési ciklusában betölthetik a reprodukciós gazda szerepét.

A további okok között, amelyek az *I. ricinus* temetőekben való fokozott előfordulásához (nagyobb helyi egyedsűrűséghez) vezettek, szerepelhet a kullancsok potenciális "beszállítóinak" más élőhelyekhez viszonyított nagyobb szerepe. Ilyenek a madarak, amelyek előszeretettel fészkelnek temetőben, ahol kisebb a ragadozók száma (Lussenhop, 1977). Mivel a hazánkban honos (és temetőinkben is fészkelő) rövid távon vonuló madárfajok a fő tavaszi kullancsszezonban érkeznek vissza telelőhelyeikről, ezek gyakran sok kullancsot hordoznak (4.5.1. fejezet).

Ugyanakkor az ezzel ellentétes tényező is fontos lehet, nevezetesen a kullancsok "elszállítóinak" más élőhelyekhez viszonyított kisebb temetői szerepe. A nagyvadak (például szarvasok) a növényzetről jelentős mennyiségű adult kullancsot vihetnek el, ami hozzájárul, hogy szezonjuk vége felé csökken a kullancsok száma. Ennek megfelelően, a szarvasok helyi hiányáról leírták, hogy kisebb (zárt) élőhelyeken a kullancsok aktivitásának növekedéséhez vezet (Perkins és mtsai, 2006).

A gazdák jelenléte mellett más biotikus és abiotikus tényezők (például a vegetáció típusa, nedvesség jelenléte) is hozzájárulhattak a kapott eredményekhez. Az *I. ricinus* éppen nem vért szívó (a környezetben található) fejlődési stádiumainak jelentős nedvességigénye (vö. "erdei" kullancsok: Uspensky, 2002) városokon belül csak bizonyos élőhely típusokon való előfordulásukat teszi lehetővé (Dautel és Kahl, 1999), amit a 2013-as budapesti vizsgálatban az erdők, parkok és temetők példáltak. Ha azonban a fűvet nyírják, az lecsökkenti a nedvességtartalmat a föld közelében, megnehezítve a kullancsok túlélését. Másfelől egyes növények, mint a borostyán (szinte folytonos levélréteggel közel a talaj szintjéhez) ideálisak lehetnek az "erdei" kullancsok számára, mert jelentős nedvesség- (pára-) tartalmat tárolhatnak, megvédik a kullancsokat a közvetlen napfény szárító hatásától és búvóhelyül szolgálhatnak az egerek és más kullancsgazdák számára (Vanderhoof-Forschner, 2003). A 2013-as budapesti vizsgálatban ritka aljnövényzetet találtunk a városi erdőkben, nyírt fűvet és helyenként borostyán lefedettséget (magas kullancsszámmal) a parkokban, és sűrű, folytonos és vágatlan aljnövényzetet vagy borostyánt, fákkal és bozóttal a temetők elhanyagolt részein. Az ilyen típusú temetői aljnövényzet (ami segít megőrizni a magas nedvességtartalmat a talajszinten), és gyakran a parkokénál zártabb felső vegetáció (ami jóval a talajszint felett megakadályozza a közvetlen napfény bejutását) szintén hozzájárulhatott a temetői magas kullancs egyedsűrűséghez.

Következésképpen, a kullancsokkal való fertőződés esélyei magasak lehetnek városon belül is, de ez nagy mértékben függ az élőhely típustól, ami főként a növényzet eltéréseiből és a kullancshordozó gazdák jelenlétének különbségeiből adódik.

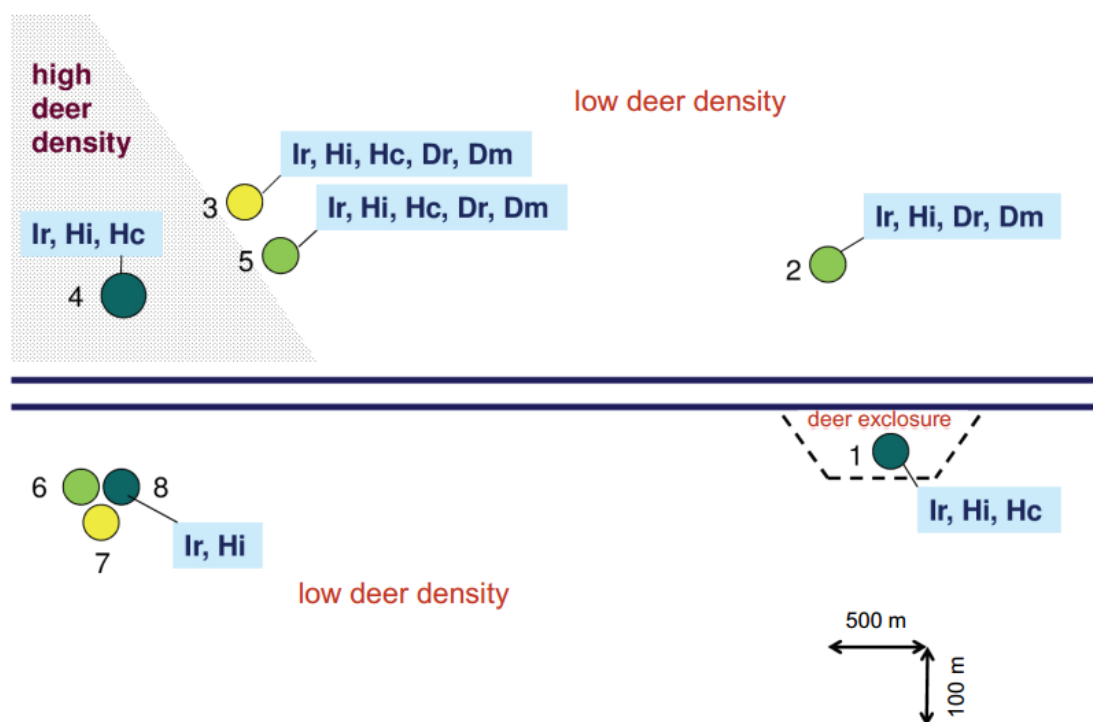
4.3.4. Az autópálya mint mesterséges barrier hatása a kullancsok előfordulására

Előzmények

Az emberi létesítmények (városok, utak) ökológiai hatása ismert: többek között a természetes élőhelyek feltöredezettségét okozhatják. Az ilyen hatásnak kitett madarakat, emlősöket leginkább önmagukban véve tanulmányozták (például Spellerberg, 1998), nem pedig kullancsgazdaként; annak ellenére, hogy a kullancsok előfordulása nagy mértékben függ gazdafajaik jelenlététől, amely utóbbiakat a mesterséges akadályok mozgásukban, populációik érintkezésében akadályozhatják (Fajs és mtsai, 2012). Jelen vizsgálatunk célja az volt, hogy egy olyan objektum (autópálya) mentén vizsgáljuk meg a kullancsok előfordulását, amely a nagyvadak szempontjából szinte átjárhatatlan akadályt jelent.

Eredmények

A 2016-os vizsgálatban egy autópálya két oldalának háromféle élőhelyén 887 kullancsot gyűjtöttünk. Ezek faji megoszlása a következőképpen alakult: 704 *Ixodes ricinus* (79,4%), 51 *Dermacentor reticulatus* (5,7%), 78 *D. marginatus* (8,8%), 35 *Haemaphysalis inermis* (3,9%) és 19 *H. concinna* (2,1%). Kullancsfajonként összehasonlítva, nem volt szignifikáns különbség az abundanciában azonos élőhely típuson belül (nem közölt adatok), csak a rétek és a ligetek esetében, mivel ezeken a *Dermacentor*-fajok csak az autópálya egyik oldalán fordultak elő (4.3.4.1. ábra: 3-as és 5-ös élőhely, szemben a 6-os és 7-es élőhellyel).



4.3.4.1. ábra. A nyolc, számozott élőhely (körrel jelölt gyűjtőhelyek) sematikus elrendezése az autópálya (dupla kék vonal) mentén, amely kelet-nyugati irányú. A körön belüli színek az élőhely típusnak felelnek meg (sötétzöld: erdő, világoszöld: liget, sárga: rét). Az adott élőhelyen gyűjtött kullancsfajok rövidített neve(i) vonallal kapcsolódnak a körhöz (Ir: *Ixodes ricinus*, Hi: *Haemaphysalis inermis*, Hc: *H. concinna*, Dr: *Dermacentor reticulatus*, Dm: *D. marginatus*). A szarvasok ismert előfordulási gyakorisága bordó vagy piros szöveggel szerepel ("high deer density" = szarvasok nagyobb egyedsűrűsége [etetik őket]; "low deer density" = szarvasok ritkább előfordulása; "deer enclosure" = szarvasok kerítéssel kizárva (autópálya pihenő)).

Megbeszélés

A 2016-os, autópálya mentén végzett kullancsgyűjtés eredményei szerint (relatív rövid távolságon belül) a *Dermacentor*-fajok előfordulása az autópálya egyik (északi) oldalára korlátozódott. A *Dermacentor*-fajok mint ún. nyílt térséget kedvelő kullancsok (Uspensky, 2002) fő élőhely típusai a legelők, rétek (4.3.1. fejezet). A hőmérséklet és a páratartalom valószínűleg nem okozhatta ezt az egyértelmű különbséget az autópálya két oldala (3-as és 7-es számú élőhelyek) között, mert azok nem tértek el jelentősen (nem közölt adatok), és a *Dermacentor*-fajok az abiotikus tényezők szélsőséges értékeivel szemben is nagyfokú toleranciát mutatnak (Zajac és mtsai, 2016). Másfelől ismert, hogy a főbb gazdafajok jelenléte vagy hiánya kulcsfontosságú a kullancsok horizontális eloszlása szempontjából (Trout Fryxell és mtsai, 2015). Így, a *Dermacentor*-fajok jelenléte a 3-as élőhelyen összefügghet a vadászterület közelségével, és a nagyvadak (szarvasfélék, vaddisznók) egyedsűrűségével, továbbá a közepes méretű ragadozók (vörös róókák) és kutyák, lovak jelenlétével, amelyek mind az adult *dermacentorok* (reprodukciós) gazdái (Nosek, 1972). A 3-as élőhelyet és a vadászterületet azonban az autópálya elválasztotta a 7-es élőhelytől, és az autópályát határoló vadvédő kerítések megakadályozzák, hogy a nagyvadak átjussanak az autópályán (Szemethy és mtsai, 1995; Csohány, 2011). Következésképpen, ez önmagában is a szarvasok kisebb egyedsűrűségéhez, ritkább jelenlétéhez vezethetett a 7-es élőhelyen. Ennek megfelelően, más vizsgálatokban is arra a megállapításra jutottak, hogy a gímszarvas (és a házi patások) hiánya a *Dermacentor*-fajú kullancsok helyi előfordulása, eloszlása szempontjából korlátozó tényezőnek számít (például Liebisch és Rahman, 1976; 4.3.3. fejezet).

Összességében elmondható, hogy az elkerített autópálya két oldalán jelentős különbség mutatkozhat azon kullancsok előfordulásában, amelyek adultjainak fő gazdái (leginkább a kerítések miatt) mozgásukban akadályozottak (ilyenek a *Dermacentor*-fajok), de úgy tűnik, nincs eltérés olyan kullancsfajok esetében, amelyeknek mozgásukban autópálya által nem akadályozott fontos terjesztői vannak (például az *I. ricinus* és a *H. concinna* esetében sünök, madarak: 4.5.1. fejezet). Az autópályák tehát hozzájárulhatnak a kullancsfajok diverzitásának helyi különbségeihez, de kullancsfajtól függő módon.

4.3.5. A természetes barrierekkel elválasztott (barlangi) denevérkullancs populációk genetikai heterogenitása

Előzmények

A legtöbb generalista kullancsfaj gazdaspektrumát jelentő emlős- és madárfajok között rendszerint vannak olyanok, amelyek populációi érintkeznek, átfednek, ami az általuk terjesztett kullancsok számára is folyamatos reprodukciós kapcsolatot, géncserét biztosít. Azonban kivételt képezhetnek ez alól az egyes barlangokban élő ("specialista") denevérkullancsok, amelyek – hacsak nincs kapcsolat a szóban forgó denevérpulációk között – egymástól többé-kevésbé kifejezett reprodukciós izolációban élhetnek. E feltételezés előzetes vizsgálatára kezdtünk hazai, egymáshoz közelebbi illetve távolabbi barlangokból származó hosszúlábú denevérkullancsok genetikai összehasonlításába.

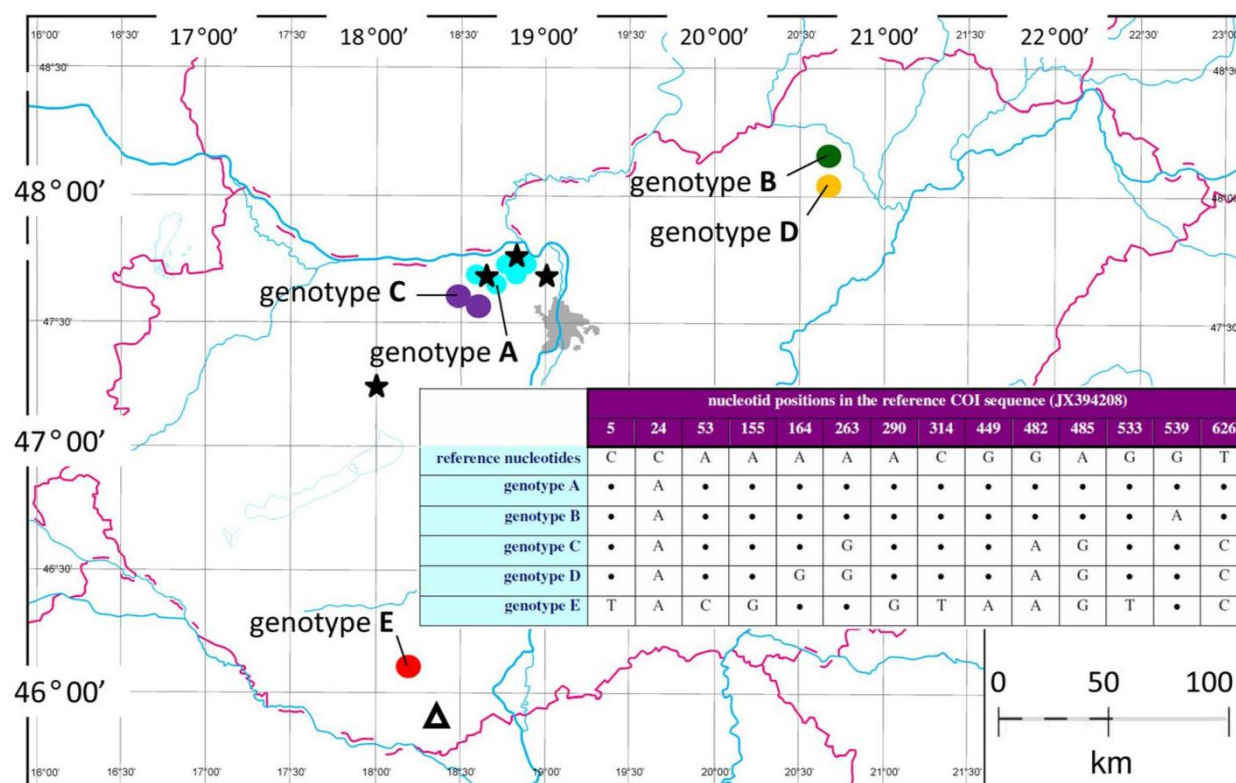
Eredmények

Ebben a vizsgálatban 535 kullancsot gyűjtöttünk: 527 példányt (220 hím, 119 nőstény, 171 nympa, 17 lárva) az *Ixodes vespertilionis* és 8 nőstényt az *I. ariadnae* fajból. Az *I. vespertilionis* populációiban – az alacsony kullancs aktivitással jellemezhető nyári hónapok kivételével – a nem parazitikus hímek túlsúlyban voltak a nőstényekhez képest. A gazdakereső nőstények jelenléte a barlangfalon kiegyenlítettnek tűnt az évszakok között (4.3.5.1. táblázat). Azonban a nympák aránya magasabb volt a tavasz és az őszi folyamán. Lárvákat március és június között találtunk.

4.3.5.1. táblázat (túloldal teteje). A gyűjtött *I. vespertilionis* példányok évszakonkénti és fejlődési stádiumonkénti megoszlása. Az évszak neve után a barlanglátogatások száma és a barlangok száma szerepel tört jellel elválasztva.

	TÉLEN (6/6)				TAVASSZAL (18/12)			
	Lárva	Nympha	Hím	Nőstény	Lárva	Nympha	Hím	Nőstény
Teljes szám	-	5	23	7	16	114	160	92
Százalék	-	14%	66%	20%	4%	30%	42%	24%
Denevérek jelenléte	+++				++			
	NYÁRON (3/3)				ŐSZEL (4/4)			
	Lárva	Nympha	Hím	Nőstény	Lárva	Nympha	Hím	Nőstény
Teljes szám	1	-	3	3	-	52	34	17
Százalék	14%	-	43%	43%	-	50%	33%	17%
Denevérek jelenléte	+				++			

Tizenöt *I. vespertilionis* példányt választottunk ki genetikai összehasonlításra (nyolcat a fő gyűjtési helyről: Pilis, Ariadne barlangrendszer; további hetet pedig más hazai barlangokból). A fő gyűjtési hely három összefüggő barlangjában csak az "A" haplotípust mutattuk ki (mind a 8 kullancs). Ezt a haplotípust két másik barlangban is megtaláltuk, 20 km-re nyugatra, de egyik másik, távolabbi barlangban sem. Két további barlangban 40 km-re délnyugatra a "C" haplotípus fordult elő, valamint három barlangban kb. 200 km-re keletre illetve dél felé három újabb haplotípus ("B", "D", "E": 4.3.5.1. ábra). Ezek a haplotípusok ("A", "B", "C", "D", "E") különböztek a referenciaként használt szekvenciától (JX394208) egy, kettő, öt, hat illetve tizenegy nukleotidban (4.3.5.1. ábra). Filogenetikai viszonyaikat egymással és más európai kullancsfajokkal a 4.1.1.4. ábra mutatja.



4.3.5.1 ábra. Magyarország térképe a barlangi, allopatrikus *Ixodes vespertilionis* haplotípusok (= "genotype", színes körökkel jelölve) földrajzi eloszlásával, illetve az *I. ariadnae* (csillagok) és az *I. simplex* (háromszög) előfordulási helyeivel. A beszúrt táblázat az egyes haplotípusok nukleotid eltéréseit mutatja a referencia szekvenciához képest, bázispár pozíció szerint (felső számsor).

Megbeszélés

Ebben a vizsgálatban kézenfekvő volt, hogy (konspecifikus) denevérkullancsokat hasonlítsunk össze, mivel azok akár gazdáikon, akár azok környezetében vannak, természetes élőhelyükként barlangokhoz kötődnek. Ezek a barlangok egymástól jól izolált és távol eső biotópokat képviselnek. Az is fontos körülmény, hogy a barlangi kullancspopulációk egymástól folyamatosan – és evolúciós szempontból hosszú távon is – szeparáltak, ami kedvezhet az elválasztó szelekciónak és eltérő irányú genetikai vonalak létesülésének, populáció szintű állandósulásának (leszámítva az olyan, rendszerint egymáshoz közeli barlangokat, amelyek között denevérmozgás, így "kullancsok cseréje" is megvalósul).

Munkánk kiindulópontjaként fontos volt, hogy a denevérek kullancsaira vonatkozó szakirodalmi adatok hiányosnak tűntek. Már egy korai összefoglaló (Arthur, 1956) is megjegyezte, hogy a fajleírások sok tekintetben elégtelenek. A legelterjedtebb faj, a hosszúlábú denevérkullancs szezonálisára vonatkozó, angol nyelven közölt adatok is relatíve újak, és a denevérről gyűjtött példányokra korlátozódnak (Ševčík és mtsai, 2010; Piksa és mtsai, 2014). Ugyanakkor, míg egyre nagyobb érdeklődés övezi a kullancsok rendszertani helyének elemzésére alkalmazott molekuláris módszereket, ezeket nem használták még denevérkullancs-fajok összehasonlítására, a szóban forgó fajok morfológiájának (Arthur, 1956) és nevezéktanának (Babos és Janisch, 1958; Beaucournu, 1966) bizonytalanságai ellenére. Ezzel a vizsgálattal tehát az volt a fő célunk, hogy legalább részben pótoljuk a hiányzó szakirodalmi adatokat, illetve hozzájáruljunk a denevér gazdákra specializálódott, így a környezetben föld alatt, barlangokban élő kullancsok taxonómiájához, a rájuk vonatkozó ökológiai ismertetekhez.

Az *I. vespertilionis* hazai, barlangi szezonálisára vonatkozó eredményeinkből kitűnt, hogy a kullancsok száma (beleértve minden stádiumot) tavasszal volt a legmagasabb, hasonlóan ahhoz, amit hazánktól északra írtak le a denevérekről gyűjtött kullancsok időbeli eloszlásáról (Ševčík és mtsai, 2010; Piksa és mtsai, 2014). A hazai vizsgálatban pre-adult fejlődési stádiumokat minden évszakban találtunk, ami folyamatos, egész évben tartó kullancs aktivitásra utalhat a föld alatti barlangok védett környezetében (tehát az időjárási változásoknak kevésbé kitéve). Eközben a kullancsok száma a denevérek mint gazdák jelenlétének függvényében emelkedik vagy csökken. Ugyanígy, az *I. simplex* lárvák és nymphák vérszívását egész évben megfigyelték, az intenzitásában szezonális változásokkal (Lourenco, 2008). A hazánkban a nyári hónapok során barlangfalról gyűjthető alacsony példányszámot a kullancsok rejtőzködésével ("átnyaralásával") magyarázhatjuk, aminek hátterében a denevérgazdák hiánya áll, mivel a denevértolonnyak többnyire más pihenőhelyet használnak télen (a hibernációhoz) és nyáron (júniusban az utódneveléshez és augusztus-szeptemberben a nászidőszak során). Arthur (1956) is megjegyezte, hogy a legtöbb forrás csak kevés hím kullancs jelenlétét említi a barlangokban. Másfelől, egy külföldi vizsgálat során nyáron és ősszel nem találtak nőstény kullancsokat a denevérekben (Piksa és mtsai, 2014), jóllehet a hazai vizsgálatban megtaláltuk ezeket a barlangfalon. Ez utóbbi nőstények vagy tavaszról maradtak itt, vagy azon nymphákból alakulhattak ki, amelyek az előző évszakban szívtak vért gazdájukon.

A kullancsok fejlődésmenetük jelentős részét a gazdán kívül töltik, sőt az *Ixodes*-fajok még párosodhatnak is a környezetben. Szemben a legtöbb kullancsfaj átfedő populációival, amelyek a földfelszín nagy területen összefüggő élőhelyeit népesítik be, az *I. vespertilionis* kisebb barlangi populációi és szűkebb biotópjai fizikailag egymástól jól szeparáltak, s csak a denevérek mozgása jelent kapcsolatot közöttük. Azonban, mivel a denevérek többsége előszeretettel tér vissza ugyanabba a barlangba telelni, ez további akadályát jelentheti az *I. vespertilionis* populációk közötti géncserének. Ennek megfelelően, ez a fizikai és "gazda viselkedési" elválasztottság nagymértékű reprodukciós izolációt vonhat maga után, ami kedvez az eltérő haplotípusok megjelenésének és fennmaradásának (illetve hosszabb távon a szétválasztó szelekciónak és speciációnak).

Vizsgálatunk adataiból kitűnik, hogy az *I. vespertilionis* fajnak országon belül is igen eltérő haplotípusai léteznek. Csak az "A" és "C" haplotípusok fordultak elő ismételtelen, és kizárólag egymás közeli barlangokban. Mivel a fő gyűjtőhelyen előforduló "A" haplotípusú kullancsokat nem találtuk meg távoli barlangokban (amelyekhez további, eltérő haplotípusok tartoztak), ezek az előzetes eredmények arra utalnak, hogy egyes *I. vespertilionis* haplotípusok bizonyos barlangokhoz köthetők. Ezzel ellentétben, a más-más eredetű *I. ricinus* izolátumok esetében a genotípus és a földrajzi elhelyezkedés

nem mutatott összefüggést (Casati és mtsai, 2008). Mint az denevérgyűrzési adatokból következtethető, a fő gyűjtési hely három barlangja és a két nyugatabbra fekvő közeli barlang között – ahol az "A" haplotípus még előfordult – van denevérmozgás (Kováts és mtsai, 2011; Kováts és mtsai, 2012), ami lehetővé teszi az *I. vespertilionis* átvitelét. Más országokban végzett denevér visszafogások is azt tükrözték, hogy az egymáshoz közeli barlangok között van denevércserélődés (Rivers és mtsai, 2006). Másfelől a nagy távolság, a hegyvonulatok vagy a denevérmozgás (vándorlás) más korlátozó tényezői megakadályozhatják a távolabbi barlangok közötti kapcsolatot (és így a kullancsok denevérek közreműködésével megvalósuló géncseréjét).

Következtetésképpen, az *I. vespertilionis* egész évben aktív hazánk barlangjaiban, de jelentősebb számban az ősz, a tél és a tavasz folyamán, míg kisebb számban "átnyaraláskor". Úgy tűnik, a barlangok mikrokörnyezete (amely a távolabbi barlangoktól jól elválasztott) kedvez allopatrikus haplotípusok kialakulásának és fennmaradásának, ami összefügg a barlangok közötti távolsággal és a bizonyos barlangokat összekötő denevérmozgással.

4.4. Kullancs közvetítette kórokozók tér- és időbeli előfordulása

4.4.1. Kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulása épületen belül

Előzmények

Annak ellenére, hogy az emberrel együtt élő (synanthrop) rágcsálók milyen gyakran fordulnak elő épületekben, járványtani szerepüket a kullancs közvetítette (illetve tágabb értelemben *vector-borne*) kórokozók szempontjából ritkán vizsgálják. Ennek részben az az oka, hogy más rágcsálókhoz képest a házi egerek (*Mus musculus*), vándorpatkányok (*Rattus norvegicus*) kevésbé jellemzően kullancs fertőzöttek (Mihalca és mtsai, 2012b). Hasonlóképpen, egyes "hemisynanthrop" rágcsálókra, így a törpeegérre (*Micromys minutus*) is ritkán kapaszkodnak kullancsok, noha élőhelyén osztozhat nála gyakrabban kullancs fertőzött rágcsáló fajokkal (Mihalca és mtsai, 2012b). Ugyanakkor ezeken a rágcsálókon is sokszor előfordulnak más vérszívó ízeltlábúak (bolhák, atkák), amelyek szintén hordozhatnak *vector-borne* (akár kullancs közvetítette) kórokozókat; ráadásul nem gazdaspecifikusak és adultként többször is vért szívhatnak, ami potenciális kockázati tényezőt jelent az ember fertőződése szempontjából. Ennek felmérése céljából fogtunk az alábbi vizsgálatba.

Molekuláris módszerek: C, E, G, H

Eredmények

Az ország északkeleti és déli határa mentén, farm- és lakóépületeken belül összesen 51 synanthrop rágcsálót fogtunk (37 házi egeret, 14 vándorpatkányt), valamint egy fél-synanthrop fajú egyed (törpeegér). Ektoparazitáik között találtunk bolhákat (tíz egéren), atkákat (három egéren) és vérszívó tetveket (két patkányon), de (élőhelyükből adódóan) nem voltak rajtuk kullancsok.

Molekuláris vizsgálatuk eredményeit az 4.4.1.1. táblázat foglalja össze. A Rickettsiales rend képviselői közül a *Rickettsia helvetica* DNS-ét mutattuk ki egy házi egérben, illetve három további házi egér bolháiban/atkáiban (4.4.1.1. táblázat). Az *Anaplasma phagocytophilum* jelenlétét is igazoltuk egératkákban (4.4.1.1. táblázat). A *Borrelia burgdorferi* s.l. fajkomplex DNS-ét egy-egy házi egér és vándorpatkány hordozta, de egyik ektoparazitában sem találtunk PCR-pozitivitást. Végül, de nem utolsó sorban egy egérbolha bartonella-pozitív volt (4.4.1.1. táblázat).

A fenti eredmények alapján az is megállapítható, hogy a rágcsálók és külső élősködők sohasem voltak kölcsönösen PCR-pozitívak (tehát PCR-pozitív ektoparaziták voltak PCR-negatív gazdán, és fordítva).

4.4.1.1. táblázat. Épületekben fogott rágcsálók ektoparazitáinak molekuláris vizsgálati eredményei.

Gazdafaj	Minta típusa	Mintaszám / gazda	Vizsgált mintaszám	PCR pozitív / összes			
				<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Bartonella</i> sp.
Mus musculus	lép	1	37	1/37	-	1/37	-
	bolha (<i>Leptopsylla segnis</i>)	1-3	10	2/10	-	-	1/10
	atka (<i>Laelaps algericus</i>)	1-15	3	1/3	1/3	-	-
Micromys minutus	lép	1	1	-	-	-	-
Rattus norvegicus	lép	1	14	-	-	1/14	-
	tetű (<i>Polyplax spinulosa</i>)	4-50	2	-	-	-	-

Megbeszélés

Az épületen belül fogott rágcsálók vizsgált ektoparazitái közül köz- és állategészségügyi, járványtani szempontból a PCR-negatívnak talált tetvek a legkevésbé fontosak, mivel a tetvek szigorú gazda fajlagosságukról ismertek, így szinte kizárólag fajtársak közötti kórokozó átvitelben játszhatnak szerepet. Ezzel szemben a bolhák és atkák szélesebb gazdaspektrummal rendelkeznek (lásd lentebb). Kullancsokat a megvizsgált házi egereken, vándorpatkányokon nem találtunk, ami megfelel a korábbi ismereteknek, tehát hogy a synanthrop rágcsálókon kullancsok ritkán fordulnak elő (Mihalca és mtsai, 2012b).

A *R. helvetica* kimutatása házi egérből és külső élősködőiből újdonságnak számít. Jóllehet ezt a zoonótikus, kórokozóképes baktériumot vadon élő rágcsálók laelapid atkáiból már kimutatták (Reeves és mtsai, 2006), úgy tűnik, a mi eredményünk igazolja elsőként házi egérben és ektoparazitáiban (bolháiban és atkáiban) való előfordulását. Más rickettsiákat nem találtunk.

Következő eredményünk, az *A. phagocytophilum* egerek atkáiban való előfordulása csoport szinten eddig is ismert volt, minthogy ezt a zoonótikus kórokozót vadon élő rágcsálók laelapid atkáiból már leírták (Reeves és mtsai, 2006). Úgy tűnik azonban, hogy a mi vizsgálatunk igazolta elsőként házi egérről gyűjtött *Laelaps algericus* fajban. E két, kullancs (*Ixodes ricinus*) közvetítette kórokozó, a *R. helvetica* és az *A. phagocytophilum* új előfordulási adatainak potenciális járványtani jelentőségét az támasztja alá, hogy a rágcsálók bolhái és atkái egyaránt szívhatnak vért emberen (Li és Xio, 1993; Robinson, 2005). A rágcsálók bolhái (a *R. helvetica* fajon kívül) más rickettsiák kompetens vektorai lehetnek (Sprong és mtsai, 2009), és a kullancsok legközelebbi rokonai, az atkák hordozhatják és potenciálisan át is olthatják az *A. phagocytophilum* fajt (Reeves és mtsai, 2006).

A köz- és állategészségügyi szempontból egyaránt fontos Lyme-kór oktanában szerepet játszó *Borrelia burgdorferi* s.l. DNS-ét is kimutattuk házi egérben és vándorpatkányban, ugyanakkor ektoparazitáik egyikében sem. Ezek az eredmények gyarapítják az e két rágcsálófaj borrelia-fertőzöttségére vonatkozóan meglehetősen hiányos szakirodalmi adatokat (Burgess és mtsai, 1993; Masuzawa és mtsai, 2004). Annak ellenére, hogy elsődlegesen kullancsok (az *I. ricinus* komplex) által közvetített kórokozóról van szó, feltételezések szerint a *Borrelia burgdorferi* s.l.-t a rágcsálók atkái is terjeszthetik (Netusil és mtsai, 2005). Ennek megfelelően nem meglepő, hogy kullancsok hiányában is találtunk PCR-pozitivitást rágcsálókban, noha a vonatkozó egyedek korábbi kullancs-fertőzöttségét nem tudjuk teljesen kizárni.

Először mutattunk ki bartonella-pozitivitást egérről gyűjtött egérbolhában (*Leptopsylla segnis*), ami megerősíti a korábban patkányról gyűjtött azonos fajú bolhára vonatkozó adatot (Loftis és mtsai, 2006). Ebben az összefüggésben fontos, hogy (egyres kullancsok [*I. ricinus*] mellett) a bolhákat is a bartonellák kompetens vektorainak tartják (Bown és mtsai, 2004), és e baktériumok előfordulnak mind vadon élő, mind városi (urbanizálódott) rágcsálókban (Telfer és mtsai, 2007; Harrus és mtsai, 2009).

A synanthrop rágcsálók és ektoparaziták PCR státusza vizsgálatunkban sohasem volt egyszerre pozitív. Ez arra utalhat, hogy akár a szóban forgó rágcsálófajok, akár bolháik és atkáik (rezervoárként) hosszabb ideig, vektor illetve gazda hiányában is hordozhatják a kimutatott kórokozót, ami még a megfigyelt alacsony prevalencia ellenére is növeli eredményeink járványtani jelentőségét.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy molekuláris vizsgálataink eredményei kompenzálják az emberi környezetben élő rágcsálók és vérszívó ektoparaziták potenciális járványtani jelentőségére vonatkozó ismereteink hiányosságait. A kimutatott kórokozók többségét (*R. helvetica*, *A. phagocytophilum* és *Borrelia burgdorferi* s.l.) tipikus esteben kullancsok közvetítik, Európában főként az *I. ricinus*. Noha tanulmányunk megerősítette, hogy a synanthrop egerek és patkányok ritkán vagy egyáltalán nem kullancs fertőzöttek, arra is fény derült, hogy e rágcsálók vagy külső élősködők ennek ellenére hordozhatnak kullancs közvetítette, zoonótikus kórokozót, sőt ott is, ahol kullancsok rendszerint nem fordulnak elő (azaz épületen belül).

4.4.2. Kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulása a városközpontban, télen

Előzmények

Az Újvilágban molekuláris módszerekkel már igazolták, hogy egyes denevér ektoparaziták (bolhák, óvantagok, poloskák, atkák) hordozhatnak *vector-borne* bakteriális kórokozót, így bartonellákat (Billeter és mtsai, 2012), azonban hasonló adatok hiányoznak a világ számos térségéből. Nemrég bartonellák jelenlétét írták le egy ázsiai és négy európai denevérfajban (Concannon és mtsai, 2005; Lin és mtsai, 2012). Mi a denevérekhez társult bartonellák vektorok általi terjedésének lehetősége szempontjából vizsgáltuk annak első feltételét, nevezetesen, hogy a denevérek vérszívó ektoparazitáiban kimutatható-e bartonella DNS (amit kiegészítettünk további *vector-borne* kórokozók elemzésével is). A vizsgált kórokozók között főként kullancs vektorral rendelkezők voltak, bár a bartonellák esetében erről megosztottak a szakvélemények (például a *Bartonella henselae* fajt – egyéb vektorok mellett – kullancs közvetítette kórokozónak tartják: Cotté és mtsai, 2008).

Molekuláris módszerek: D, E, H

Eredmények

A 2011-ben télen, barlangfalról eltávolított denevérek kullancsok, illetve Budapest belvárosában elgyengülten talált denevérekről gyűjtött külső élősködők molekuláris vizsgálatának eredményei a következők voltak. A hosszúlábú denevérek kullancs (*Ixodes vespertilionis*) egy nőstény példánya *Bartonella*-pozitivitást mutatott (4.4.2.1. táblázat). További külső élősködők, amelyek bartonella DNS-t hordoztak, a nyolcfésűs denevérbolha (*Ischnopsyllus octactenus*), két atkafaj (*Steatonyssus occidentalis*, *Spinturnix myoti*) és egy denevérlégy-faj (*Nycteribia* sp.) (4.4.2.1. táblázat).

A *Spinturnix* atkák átlagos Ct értéke (33,5±2) jóval alacsonyabb volt a dermanysoid atkákénál és a nagyobb denevérlégyekénél (42,4±1,5) azonos tesztben, ami a bartonella DNS mennyiségének három nagyságrendnyi különbségére utal az előbbiekre javára. Minthogy a PCR-pozitív minták Ct értéke következetesen 30 felett volt, szekvenálásra épülő faji azonosítás nem volt lehetséges.

Valamennyi denevér ektoparazita negatívnak bizonyult a következő kórokozókra: *Borrelia burgdorferi* s.l., *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, haemoplasmák és *Anaplasma phagocytophilum* (annak dacára, hogy ezek a vizsgálati régióban előfordulnak: nem közölt módszer és adatok). Egy hím hosszúlábú denevérek kullancs (*Ixodes vespertilionis*) azonban PCR-pozitív volt az Anaplasmataceae családra: a felerősített, 452 bp hosszúságú szekvencia (JQ478427) 99% egyezést mutatott *wolbachia* genotípusokéval.

Az ötfésűs denevérbolha (*Nycteridopsylla eusarca*) mintája *Rickettsia helvetica* DNS-t tartalmazott. További 45, ugyanerről a denevérről gyűjtött vért szívott atka PCR eredménye viszont negatív volt.

4.4.2.1. táblázat. A minták és molekuláris eredmények összefoglalása.

(Példány) minta forrása (gazdafaj)	Minta kategória (faj vagy genus)	Mintaszám <i>pool</i> -onként*	PCR pozitív/mind	Kimutatott (endosymbionta) vagy kórokozó
Barlangfal	kullancs (<i>Ixodes vespertilionis</i>)	Males: 1	1/31	(<i>Wolbachia</i> sp.)
		Females: 1	1/7	<i>Bartonella</i> sp.
		Nymphs: 10	0/5	–
		Larvae: 2	0/1	–
(3) Nyctalus noctula a,b,c	bolha (<i>Nycteridopsylla eusarca</i>)	1 ^a / 2 ^c	1^c / 2	<i>Rickettsia helvetica</i>
	bolha (<i>Ischnopsyllus octactenus</i>)	1 ^b	1/1	<i>Bartonella</i> sp.
	atka (<i>Macronyssus kolenati</i>)	29 ^a /45 ^c	0/2	–
	atka (<i>Spinturnix</i> sp.)	1 ^b	0/1	–
(1) Eptesicus serotinus	atka (<i>Steatonyssus occidentalis</i>)	100	0/1	–
(4) Myotis myotis e,f,g,h	atka (<i>Steatonyssus occidentalis</i>)	23 ^e / 28 ^f / 35 ^g / 90 ^h	1/4	<i>Bartonella</i> sp.
	atka (<i>Spinturnix myoti</i>)	17 ^f / 20 ^h / 48 ^g	3/3	<i>Bartonella</i> sp.
	légy (<i>Nycteribia</i> sp.)	1 ^f /1 ^h	2/2	<i>Bartonella</i> sp.

* Az azonos gazdafaj különböző egyedeiről gyűjtött mintákat a soron belül ferde vonal választja el; az azonos gazda egyedről gyűjtötteket függőlegesen azonos felső index jelöli. A pozitív eredményeket piros szám emeli ki.

Megbeszélés

A 2011-es vizsgálatban használt ízeltlábúakat általánosságban, csoportszinten tekintve, a *Spinturnix* nembe tartozó atkák és a nycteribid denevérlegyek gazdaspecifikus, permanens ektoparaziták, amelyek rendszerint (ritka kivételtől eltekintve: Lloyd, 2002) nem szívnak vért más gazdafajokon, mint tipikus gazdáikon, a denevéreken. A kullancsokat, az óvanyagokat és a bolhákat azonban kevésbé szoros gazdafajlagosság jellemzi, és temporer élősködők, amelyek fejlődésmenete részben a környezetben zajlik, így speciális gazdakeresési mechanizmussal és szélesebb gazdakörrel rendelkeznek (Balashov, 2006). Ily módon a kullancsok, az óvanyagok és a bolhák jelentősebb szerepet tölthetnek be zoonótikus kórokozók átvitelében, ahogy ezt a denevéróvanyagok emberen való vérszívása is példázza (Jaenson és mtsai, 1994).

Az *I. vespertilionis* gazdakereső populációiban, a barlangfalakon a hímek domináltak (4.4.2.1. táblázat), ami érthető a korábbi megfigyelés tükrében, melyek szerint a hímeket sohasem találhatjuk meg gazdáikon, a denevéreken (Arthur, 1956). Fontos körülmény vizsgálataink eredményeinek jelentősége kapcsán, hogy e kullancsfaj (1) barlangokon és faodvakon kívül az ember környezetében (akár épületen belül) is előfordul, így házak padlásán, pincékben, ahol denevérek pihennek (Ševčík és mtsai, 2010); továbbá (2) vért szívhat emberen (Piksa, 2012). Ennek következtében az *I. vespertilionis* nemcsak térbeli előfordulásában, eloszlásában tér el más *Ixodes*-fajoktól, hanem a felszíni környezethez képest jóval állandóbb hőmérsékletű tartózkodási helyeinek köszönhetően szezonális aktivitásában is, lévén (védett élőhelyén) télen is aktív (Arthur, 1956; Ševčík és mtsai, 2010; 4.3.5. fejezet).

Bartonella-pozitivitás mutatkozott az egyik *I. vespertilionis* nőtény esetében (4.4.2.1. táblázat), ami valószínűsíti, hogy a szóban forgó baktériumfaj patkósorrú denevérekben (*Rhinolophus* spp.), e kullancsfaj kedvelt gazdáiban (Piksa és mtsai, 2014) is előfordul. *Bartonellát* más szerzők már több

Ixodes-fajban kimutattak (Billeter és mtsai, 2008). Mindazonáltal, legjobb tudomásunk szerint, ez az első kimutatása e baktériumcsoportnak a téli aktivitással jellemezhető hosszúlábú denevérekullancsban (*I. vespertilionis*), és az *Ixodes* nem olyan fajában, amely nem az *I. ricinus* fajkomplexbe tartozik.

A kullancson kívül bartonella-pozitivitást tapasztaltunk bolhában, atkáknak és denevéregegyekben (4.4.2.1. táblázat). Figyelembe véve, hogy a macskabolha (*Ctenocephalides felis*) a *Bartonella henselae* vektoraként ismert (Chomel és mtsai, 1996), továbbá bartonellákat kimutattak már újvilági denevérbolhából (Billeter és mtsai, 2008), saját eredményünk (tehát e baktériumok kimutatása egy további bolha nemből és fajból) amellettt szól, hogy a denevérbolháknak szerepe lehet a bartonellák átvitelében. Hasonlóképpen, a *Steatonyssus* genus atkáit bartonella PCR-pozitívnak találták az Újvilágban (Billeter és mtsai, 2008), valamint – az itt vizsgált denevéregegyekkel szoros rokonságban álló – kullancsegyek is hordozhatják, átolthatják e kórokozókat (Billeter és mtsai, 2008). Következésképpen, valamennyi külső élősködő faj, amelyet e vizsgálatban *Bartonella* PCR-pozitívnak találtunk, új potenciális vektora e kórokozóknak az Óvilág vonatkozásában (sőt rendszertani értelemben is: faj [kullancsok, atkák] vagy nem [bolhák] vagy család [denevéregegyek] szinten). A Ct értékek alapján a spinturnicid atkák hordozták legjelentősebb mennyiségben a bartonellákat.

Az egyéb *vector-borne* baktériumcsoportokra vonatkozó negativitás mellett a hosszúlábú denevérekullancsban (illetve bármilyen denevér ektoparazitában) elsőként sikerült wolbachia szekvenciát kimutatni. Bár e baktériumcsoport szimbionta szerepe ismert számos ízeltlábú csoport esetében, a kullancsok wolbachia-hordozása parazitoid darazsaktól is származhat (Plantard és mtsai, 2012).

Egy ötfésűs bolha (*Nycteridopsylla eusarca*) *R. helvetica*-pozitív volt (4.4.2.1. táblázat). Érdekes, hogy az ugyanarról a denevérről gyűjtött 45, vért szívott (és tartalmazó) atka ugyanebben a tesztben PCR-negatívnak bizonyult. Ez arra utal, hogy a szóban forgó bolha már vérszívása előtt hordozta a *R. helvetica*-t. Ezt a baktériumfajt már kimutattuk korábban is bolhákból (például macskabolhából: Hornok és mtsai, 2010), de ez a *R. helvetica* első igazolása denevérbolhából, illetve bármilyen denevér ektoparazitából. Mivel a denevérbolhák jellemzően nem szívnek vért más rendbe tartozó gazdákból, eredményünk felveti annak lehetőségét, hogy a denevérek a *R. helvetica* rezervoárjai, más rickettsiákhoz hasonlóan (Billeter és mtsai, 2008).

Az a denevér, amelyen a *R. helvetica*-pozitív bolha volt, elgyengült állapotban, a földön feküdt télen Budapest belvárosában, amikor és ahol e baktériumfaj ismert vektora, az *I. ricinus* kullancsfaj nem fordul elő. E szituáció járványtani szempontból azért érdekes, mert a kisebb emlősök bolhái (amelyek emberen csak elvétve fordulnak elő) akár masszív fertőzöttséget is okozhatnak emberen, ha eredeti gazdáik lakóházakban, farm- illetve kerti épületekben vagy azok közelében tartózkodnak, hibernálódnak vagy elgyengülnek, elpusztulnak (Pomykal, 1985). Továbbá, a bolhafaj, amelyet itt *R. helvetica*-fertőzöttnek találtunk, télen aktív (Rupp és mtsai, 2004), szemben a *R. helvetica* kullancs vektorával, az *I. ricinus* fajjal.

Összefoglalásképpen, ezek az eredmények szélesítik bizonyos kullancs közvetítette kórokozók (a *R. helvetica*, esetleg a bartonellák) potenciális vektorainak körét: elsősorban olyan denevér ektoparazitákkal, amelyek – Európa kontinentális éghajlati viszonyai között – télen is aktívak, szemben e kórokozók kullancs vektoraival. Azon vérszívó ízeltlábúak, amelyek szorosabb gazda-fajlagossággal jellemezhetőek, vélhetően a bartonellák denevérek közötti terjesztéséért felelősek, míg a tágabb gazdaspektrummal rendelkező bolhák (kullancsok) kockázati tényezőt jelenthetnek más emlősök, így az ember felé történő átvitel szempontjából. Első alkalommal állapítottuk meg e zoonotikus ágensek synanthrop denevérfajokkal összefüggő előfordulását városi környezetben, ami egyúttal annak indikátora is, hogy a szóban forgó baktériumokat a repülő denevérek (mint rezervoárok) gyorsan behurcolhatják és akár fenn is tarthatják urbanizált élőhelyen.

4.4.3. Városi élőhelyek hatása kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulására

Előzmények

A városi környezetben végzett kullancs felmérések és e kullancsok molekuláris vizsgálatai *vector-borne* kórokozókra gyakran egyféle kullancs élőhelyet céloznak (például: Di Luca és mtsai, 2013). Ugyanakkor a városi kullancs élőhelyek meglehetősen heterogének (Dautel és Kahl, 1999). Alábbi tanulmányunkkal arra szeretnénk volna rávilágítani, hogy egyes városi élőhely típusok befolyásolhatják a kullancs közvetítette kórokozók előfordulási gyakoriságát, így a velük kapcsolatos járványtani kockázatot. Vizsgálatunkat a leggyakoribb európai kullancsfaj, az *Ixodes ricinus* nőtényeire alapoztuk, mivel a két kimutatni tervezett kórokozó (csoport), az *Anaplasma phagocytophilum* és a *Borrelia burgdorferi* s.l. jellemzően transzstadiálisan adódnak tovább (Ogden és mtsai, 1998; Stanek és mtsai, 1986), így legnagyobb esély a jelenlétükre adult stádiumban van (illetve az *Ixodes*-fajú hímek nem szükség-szerűen szívnek vért).

Molekuláris módszerek: C, G

Eredmények

A 2013-as budapesti kullancsfelmérésben élőhely típusonként megvizsgáltuk az *Anaplasma phagocytophilum* és a *Borrelia burgdorferi* s. l. prevalenciáját *Ixodes ricinus* nőtényekben. Ezeket az eredményeket a 4.4.3.1. táblázat foglalja össze.

4.4.3.1. táblázat. Három városi élőhelytípus összehasonlítása zoonótikus, kullancs közvetítette kórokozók szempontjából, az ott gyűjtött *Ixodes ricinus* nőtények molekuláris vizsgálata alapján. Az egy oszlopban azonos felső betűvel jelölt számok szignifikánsak nem különböznek.

Élőhelytípus ¹	Az <i>I. ricinus</i> nőtények PCR eredményei (pozitív / összes)	
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Borrelia. burgdorferi</i> s.l.
Temető	2/80 ^a (2.5%)	25/80 ^a (31.3%)
Park	10/80 ^b (12.5%)	33/80 ^{a,b} (41.3%)
Erdő	9/80 ^{a,b} (11.3%)	40/80 ^b (50%)

¹Koordinátákat lásd 4.3.3. fejezet.

Az *A. phagocytophilum* összesített prevalenciája 8,8% volt (240-ből 21 PCR-pozitív, CI: 5,5–13,1%). A PCR-pozitív minták aránya szignifikánsan alacsonyabb volt temetőben, mint parkokban ($P = 0,03$), illetve mint parkokban és erdőben együttesen ($P = 0,015$) (4.4.3.1. táblázat). Összesen az *I. ricinus* nőtények 40,8%-a volt *B. burgdorferi* s.l. fertőzött (240-ből 98 PCR-pozitív, CI: 34,6–47,3%).

Szignifikánsan kevesebb *I. ricinus* nőtény hordozta e kórokozót temetőben, mint erdőben ($P = 0,024$) (4.4.3.1. táblázat).

Megbeszélés

A 2013-as budapesti kullancsfelmérés során *I. ricinus* nőtényekben mért *A. phagocytophilum* és *B. burgdorferi* s.l. prevalencia szignifikánsan alacsonyabb volt a temetőben, mint az erdőben, parkokban. Ehhez hasonlóan, negatív korrelációt állapítottak meg a kullancsok előfordulási gyakorisága (abundanciája) és azok fertőzöttség extenzitása (prevalenciája) között, éppen az *I. ricinus* és a *B. burgdorferi* s.l. esetében (Gray és mtsai, 1999). Ezen eredmények hátterében olyan tényezők állhatnak, mint például a helyi kullancs gazdák jelenlétének, egyedsűrűségének élőhelyfüggő változatossága. Ezek a kullancsgazdák ugyanis különböznek az *A. phagocytophilum* és a *B. burgdorferi* s.l. járványtani ciklusában betöltött rezervoár szerepük szempontjából (Cavia és mtsai, 2009; Richter és mtsai, 2011; Keesing és mtsai, 2012).

Összességében tekintve, városi környezetben végzett vizsgálatunk során az *I. ricinus* nőtényekben az *A. phagocytophilum* és a *B. burgdorferi* s.l. prevalenciája szignifikánsan magasabb volt, mint amit korábban hazai természetes (vagy vidéki) élőhelyeket mértek (Rigó és mtsai, 2011). Ezt az eredményt is részben az magyarázza, hogy más-más rezervoárok vannak jelen vagy hiányoznak urbanizált biotópokban és városon kívüli, erdei környezetben (Silaghi és mtsai, 2008). Általában jellemző, hogy az urbanizált élőhelyeken lecsökken a biodiverzitás, ami megnövelheti egyes kórokozók átvitelének esélyeit és ezen keresztül prevalenciáját (Keesing és mtsai, 2010). Konkrétabban, természetes élőhelyeken a városiakhoz képest magasabb biodiverzitás jellemző, de a potenciális kullancs gazdák egyedsűrűsége a városokban magasabb (kivéve a nagy emlősök esetében). Ez urbanizált területeken kedvezhet a kullancs közvetítette kórokozók átvitelének, még akkor is, ha a peridomesticus (házi- és synanthrop) állatfajok adott esetben kevésbé kompetens rezervoárok a természetes/vidéki környezetben élőkhöz képest (Richter és mtsai, 2011). Ráadásul, a jelentősen szennyezett városi környezetben a kullancsok olyan kóros elváltozásokat szenvedhetnek, amelyek fogékonyabbá tehetik őket kullancs közvetítette kórokozókra, és ez megnövelheti fertőzöttségük arányát (Aleksjev és Dubinina, 2008).

Következésképpen, a kullancs közvetítette kórokozókkal történő fertőződés esélyei magasak lehetnek városon belül is, de ez nagy mértékben függ az élőhely típustól, ami elsősorban a kullancs gazdák mint kórokozó rezervoárok jelenlétének helyi különbségeiből adódik.

4.4.4. A *Babesia canis* szezonális *Derma-centor reticulatus* kullancsfajban városi élőhelyeken

Előzmények

Kevés szakirodalmi adat áll rendelkezésre a kullancsokban előforduló kórokozók szezonális prevalencia eltérésére vonatkozóan, és azok is főként Európa legfontosabbnak tartott kullancsfaja, az *Ixodes ricinus* vizsgálatából származnak. E kullancsfajban az *Anaplasma phagocytophilum* (Polin és mtsai, 2004), a *Rickettsia helvetica* (Kantsø és mtsai, 2010) és a *Borrelia burgdorferi* s.l. (Mysterud és mtsai, 2013) leggyakrabban a tavaszi periódusban volt kimutatható. Hazai vizsgálatunk során ebben az összefüggésben a kontinens másik kiemelt, növekvő jelentőségű kullancsfaja, a *Derma-centor reticulatus* által átvihető, állategészségügyi szempontból legfontosabbnak tartott kórokozó, a *Babesia canis* szezonális prevalenciáját elemeztük. Munkánk fontos kiindulópontja volt, hogy a kutya babesiosis klinikai eseteinek túlnyomó többségét Közép-Európa egyes városaiban tavasszal jelentették (Csikós és mtsai, 2001; Pavlović és mtsai, 2002), míg a vektor szerepet játszó *D. reticulatus* magasabb őszi aktivitásáról ismert (4.3.2. fejezet).

Molekuláris módszer: K

Eredmények

Ebben a 2014-2015-ös vizsgálatban összesen 852 *D. reticulatus* adultot gyűjtöttünk e faj két, korábban azonosított budapesti élőhelyén (I-es élőhely: 621 egyed, II-es élőhely: 231 egyed).

Az I-es élőhelyen a hím kullancsok gyakoribbak voltak a nőtényeknél az ősz kezdete körül (augusztus-szeptember: 43 hím vs. 15 nőtény), szemben a vizsgálati periódus további hónapjaival a következő nyárig (233 hím vs. 330 nőtény), ami szignifikáns ($P < 0,0001$) különbséget jelent e két időszak között (4.4.4.1. táblázat). A II-es élőhelyen az ivararány kiegyenlítettebb volt minden évszakban (4.4.4.1. táblázat). A hím *D. reticulatus* példányok átlagmérete következetesen (minden hónapban) a nőtényeké felett volt (nem közölt adatok).

A II-es élőhelyen, a tél és a tavasz folyamán nem volt szignifikáns különbség a kullancsok átlagméretében olyan hónapok között, amelyekben (a) a nőtények domináltak (például február) vs. (b) amelyekben a hímek-nőtények aránya kiegyenlítettebb volt (például április), ami arra utalhat, hogy a *D. reticulatus* egyedek kisebb átlagmérete ebben a periódusban az őszihez képest nem az ivararány változásaival függ össze.

4.4.4.1. táblázat. Havonta mért adatok: kullancsok száma azok ivara szerint, a kullancsok átlagmérete mm-ben a szórással együtt, és a molekuláris vizsgálat eredménye: babesia-fertőzöttek száma az összes vizsgált közül és az azonosított genotípus. A piros, vastag számok azon mintacsoportokat jelölik, amelyek között volt PCR pozitív. A világoskék háttér kiemeli azon hónapokat/periódusokat, amikor kisebb volt az átlagos kullancsméret. A lila pöttyök száma azon kullancsok számát jelöli, amelyek az adott genotípust hordozták.

hónapok	Augusztus	Szeptember	Október	November	December	Január	Február	Március	Április	Május	Június
kullancs szám											
hím	2	41	45	46	15	21	33	38	26	9	0
nőstény	0	15	45	76	16	27	39	46	49	29	3
átlagméret	3,6±0,1	3,6±0,5	3,7±0,1	3,7±0,4	3,7±0,4	3,7±0,3	3,7±0,3	3,7±0,3	3,6±0,3	3,5±0,2	3,3±0,3
<i>B. canis</i> pozí-	n.e.t.	0/11	0/22	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	1/11	0/9	n.e.t.
tív / összes	n.e.t.	0/12	0/24	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	4/14	n.e.t.
genotípus: 18S-A									•		
genotípus: 18S-B										••••	
kullancs szám											
hím	0	10	20	7	6	12	8	9	15	1	0
nőstény	0	13	28	16	20	10	18	22	15	1	0
átlagméret	-	3,6±0,4	3,7±0,3	3,7±0,3	3,6±0,3	3,5±0,4	3,5±0,4	3,5±0,3	3,5±0,3	3,4±0,1	-
<i>B. canis</i> pozí-	-	0/10	0/11	0/7	0/6	0/12	3/8	2/9	3/12	n.e.t.	-
tív / összes	-	1/13	0/12	0/16	2/17	4/10	7/15	5/14	2/11	n.e.t.	-
genotípus: 18S-A		•			••	••••	••••••••	••••••••	•		
genotípus: 18S-B							•	•		••••	

Rövidítések: n.e.t. – nem elvégzett teszt

A molekulárisan vizsgált kullancsok 8,2%-a volt PCR-pozitív piroplasmákra. A szekvenálás ezek mindegyikében *B. canis* fajt azonosított, amelynek két 18S rRNS genotípusát mutattuk ki ("A", "B"). Az I-es élőhelyen a "B" volt a gyakoribb genotípus, míg a II-es élőhelyen az "A" dominált (4.4.4.1. táblázat).

Az I-es élőhelyen *B. canis*-fertőzött kullancsokat csak tavasszal találtunk. A kullancsok átlagmérete áprilistól csökkent, a *B. canis* egyidejű megjelenésével (4.4.4.1. táblázat). Hasonlóképpen, a II-es élőhelyen a *B. canis* hordozó kullancsok szignifikánsan ($P < 0,0001$) gyakoribbak voltak télen és tavasszal (114-ből 28: 24,6%, CI 17–33,5%), mint ősszel (69-ből 1: 1,4%, CI 0–7,8%). Ezen az élőhelyen a kullancsok átlagmérete decemberben kezdett csökkenni, ami megfelelt azon periódus kezdetének, amikor a *B. canis*-fertőzött kullancsok egyre növekvő számban jelentek meg (4.4.4.1. táblázat). A fertőzött kullancsok aránya február végén volt a legmagasabb, 43,5% (23-ből 10, CI: 23,2–65,5%), és áprilisa lecsökkent (4.4.4.1. táblázat). A II. számú élőhelyen a havi átlagos kullancsméret (beleértve mindkét ivart) és a *B. canis*-fertőzött kullancsok aránya szeptembertől ápriliséig szignifikáns negatív korrelációt mutatott (Spearman rangkorreláció: $\rho = -0,97$, $P < 0,0001$).

Ezen túlmenően, egy legalább egy hónapos időbeli eltolódást figyeltünk meg a két *B. canis* genotípus megjelenésében: mindkét élőhelyen az "A" korábban jelent meg a "B"-hez képest, és a II-es élőhelyen az "A" dominanciája összességében is megelőzte a "B"-t (4.4.4.1. táblázat). Statisztikailag, a II-es élőhelyen december és március között az "A" genotípus szignifikánsan ($P = 0,0004$) gyakoribb volt a "B" genotípusnál, április hónappal összevetve (4.4.4.1. táblázat).

A szezonaritást összességében tekintve a *B. canis*-fertőzött kullancsok hamarabb jelentek meg a II-es számú élőhelyen (4.4.4.1. táblázat).

Megbeszélés

A 2014-2015-ös vizsgálat során *D. reticulatus* kullancsfaj Budapesten gyűjtött példányait vizsgáltuk. A molekuláris módszereken kívül fontos következtetéseket vonhattunk le a *D. reticulatus* adultok méretéből, ami – mint morfológiai bélyeg – a kullancsok esetében főként a fajok közötti összehasonlítás alapja lehet, de alkalmas fajon belül is fontos élettani, ökológiai következtetések levonására. Így például vizsgálatunk során a hím *D. reticulatus* példányok átlagmérete felülmúlta a nőstényekét, ami megfelel e faj ismert ivari dimorfizmusának, tehát, hogy a hímek nagyobbra nőnek a nőstényeknél (Nosek és Sixl, 1972). Ez egyúttal az ún. nyílt térségi kullancsok fontos ismérve (Uspensky, 2002), ahová a *Dermacentor*-fajok is tartoznak (vö. a jelen tanulmánybeli I-es és II-es biotóp). Másfelől (ivaron belül) az egyedek kisebb mérete összefügg azzal, hogy nemrég vedlettek át nyympha stádiumból adulttá: minden *D. reticulatus* egyed, amely nyymphából adulttá vedlik tavasszal, kisebb méretű (Nosek, 1979).

Az I-es élőhelyen tavasszal a kisebb méretű példányok megjelenése (amit áprilistól az átlagméret csökkenése jelzett) egybeesett a babesia-hordozó kullancsok megjelenésével, míg a II. számú élőhelyen a havi átlagos kullancsméret és a *B. canis*-fertőzött kullancsok aránya szeptembertől ápriliséig szignifikáns negatív korrelációt mutatott (vagyis a kisebb kullancsokkal jellemezhető populációban több volt a babesia-pozitív). Mivel a kullancsok kisebb átlagmérete (az I-es élőhelyen áprilistól, a II-es élőhelyen decembertől) a nyymphából frissen vedlett adultok jelenlétére utal, a fenti eredmények azt sugallják, hogy a *B. canis*-fertőzött kullancsok előfordulása, illetve gazdakereső aktivitása valószínűbb akkor, amikor "fiatal" adultok vannak a populációban, tehát az aktivitási (gazdakeresési) szezon elején.

Eredményünkhöz, hogy a babesia-hordozó kullancsok nagyobb arányban keresnek gazdát tavasszal, mégpedig az aktivitási periódus elején, hasonló jelenségeket figyeltek meg más kullancskórokozó társulásoknál is, legfőképp az *I. ricinus* közvetítette kórokozók prevalenciájának szezonális változásai (tavaszi dominanciája) kapcsán (Polin és mtsai, 2004; Kantsø és mtsai, 2010; Mysterud és mtsai, 2013). Ezt részben azzal magyarázták, hogy a szóban forgó kórokozó hatással lehet a kullancs viselkedésére, például tavasszal a fertőzött kullancsok aktívabbak a nem fertőzötteknél (Mysterud és mtsai, 2013). Még fontosabb a jelen összefüggésben, hogy a babesia-fertőzöttség fokozza a kullancsokban a metabolikus enzimek aktivitását (Rachinsky és mtsai, 2008), és ez a megnövekedett anyagcserezint (és így az energiatartalék hamarabb bekövetkező kimerülése) fontos tényező lehet a *B. canis* fertőzött "éhesebb" *D. reticulatus* kullancsok nagyobb (korábbi) aktivitásában.

Egy ilyen mechanizmus előnyös lehet a transovarialis öröklődő kórokozónak (amelyeket itt a *B. canis* példáz), hogy biztosítsa a fertőzött *D. reticulatus* nőstények peterakását még a nyár, tehát a lárvák aktivitási periódusa előtt (Nosek, 1972). Ennek megfelelően számos, paraziták által indukált hatás (amit vektoruk viselkedésére fejtenek ki) végső soron az új gazdába való átjutásuk esélyét növeli meg, ahogy ezt a *B. microti* esetében is leírták *I. trianguliceps* kullancsfajban (Randolph, 1991).

A *D. reticulatus* kullancsfajban Budapesten kimutatott két *B. canis* 18S rRNS genotípus ("A" és "B") megfelel e protozoon Európában leírt két variánsának (Adaszek és Winiarczyk, 2008; Carcy és mtsai, 2015). A két genotípus európai szintű, országok közötti térbeli mintázatát már leírták (Carcy és mtsai, 2015), de a hazai vizsgálatban elsőként mutattunk rá arra, hogy (1) ezek egymáshoz közeli biotópokban is eltérő prevalenciával lehetnek jelen (mivel a budapesti *D. reticulatus* élőhelyek egyikén az "A", a másikon a "B" dominált), valamint (2) az "A" és "B" genotípus megjelenése/jelenléte között időbeli eltolódás is lehet, ami következetes volt a két vizsgált élőhely szempontjából (mindkettőn az "A" genotípus jelent meg hamarabb). Leírták, hogy a *B. canis* e két változata kutyában eltérő pathogenitását (Adaszek és Winiarczyk, 2008), így a budapesti vizsgálat eredményei szerint a szóban forgó élőhelyeken a kutyák előbb fertőződhetnek volna a kisebb kórokozó-képességű ("A") *B. canis* genotípussal, mint a patogénebbnek tekintett "B" változattal.

A *D. reticulatus* szezonális aktivitásának egészét tekintve megfigyelhető volt, hogy a II-es számú élőhelyen a *B. canis*-fertőzött kullancsok hamarabb jelentek meg (váltak aktívvá). Az I-es élőhelyhez képest (amely inkább ipari parkhoz hasonló) a II-es biotóp védettebb, mivel utcák és házak veszik körül egy sűrűbben lakott területen. Így feltételezhető, hogy ez utóbbi élőhely, ahol a kullancsokat korábbi aktivitás jellemezte, az ún. városi hősziget hatásnak van kitéve (Wickham és mtsai, 2013). A sűrűbben lakott területen keletkező hőtöbblet ugyanis hozzájárulhatott a *D. reticulatus* hamarabbi aktiválódásához és vedléséhez (ez utóbbi a kisebb méretű adultok megjelenése alapján már a tél folyamán megkezdődött).

Ebben az összefüggésben, a *B. canis*-fertőzött *D. reticulatus* kullancsok vizsgálatunk során megfigyelt szezonális eloszlása leginkább a városi élőhelyekre lehet érvényes, mint ahogy erre a kutya babesiosis esetszám más, közép-európai nagy városokban és környékükön megfigyelt hasonló, tavaszi dominanciája utal (Szekszárd: Csikós és mtsai, 2001; Belgrád: Pavlović és mtsai, 2002). A *D. reticulatus* populációi urbanizált területeken fragmentáltak, és az élőhelyeket összekötő gazdák (amilyenek a vadon élő patások és ragadozók: Nosek, 1972) hiányozhatnak vagy számuk alacsony. E korlátozó tényezők (tehát a városi élőhelyek elválasztottsága) miatt lehetséges, hogy az ilyen biotópokban az azonos fajú kullancsok életciklusa könnyebben szinkronizálódik, és a fertőzött kullancsok egyidejű aktivitást mutathatnak a bennük élő kórokozók hatására. Feltételezzük, hogy a gazdafajoknak az egyes élőhelyeken rendelkezésre álló spektruma szerepet játszik az ottani kullancsok által hordozott kórokozók prevalenciájának évszakos változásában (Mysterud et al., 2013). Ezzel szemben, az ilyen korlátozó tényezők hiánya jellemezheti a természetes élőhelyeket, ahol a *D. reticulatus* kullancsfaj életciklusa szinkronizáltságának hiányában (Nosek, 1979) a *B. canis* fertőzöttség eltérő szezonális mutathat, különösen, ha a kutya babesiosis eseteket nagyobb földrajzi térségben vizsgálják (pl. Leschnik és mtsai, 2008).

Összességében, a *B. canis* hordozó *D. reticulatus* kullancsok szezonális eloszlása egy év alatt a városi élőhelyeken nem véletlenszerű volt. Feltételezzük, hogy hasonló ökológiai körülmények között a kutya babesiosisának szezonális előfordulását nem önmagában véve a kompetens vektorok jelenléte határozza meg, hanem befolyásolja a babesia-fertőzött kullancsok korai aktivitása. Az eltérő *B. canis* genotípusokat hordozó *D. reticulatus* kullancsok időbeli eloszlása is egyenlőtlen volt. Mindazonáltal ahhoz, hogy végső következtetéseket vonjunk le a fenti összefüggésben, a hasonló adatok gyűjtését célszerű lenne éveken keresztül folytatni.

4.4.5. Az autópálya mint mesterséges barrier hatása kullancs közvetítette, bakteriális kórokozók előfordulására

Előzmények

Legjobb tudomásunk szerint nem végeztek még olyan felmérést, amely azt vizsgálta volna, hogy az autópálya hatással van-e a kullancs közvetítette kórokozók öko-járványtanára. Hipotézisünk szerint ugyanis egy ilyen barrier befolyásolja e kórokozók prevalenciáját az által, hogy az azokat hordozó (és kullancs fertőződési forrásként szolgáló) rezervoárokat mozgásukban eltérőképpen akadályozza. Vizsgálatunkhoz azt a három, *Ixodes ricinus* által közvetített kórokozót választottuk, amelyek fő rezervoárjai vagy nagyméretűek és nem tudnak átjutni az autópálya vadvédő kerítésén (*Anaplasma phagocytophilum*: szarvasfélék), vagy épp ellenkezőleg (*Borrelia burgdorferi* s.l. rágcsálók és *Rickettsia helvetica*: kullancsok, madarak).

Molekuláris módszerek: C, E, G

Eredmények

Az autópálya menti élőhelyeken gyűjtött *I. ricinus* nőtényeket vizsgáltuk kullancs közvetítette baktériumok DNS-ére. E molekuláris vizsgálatok eredményeit a 4.4.5.1. táblázat foglalja össze.

Az *A. phagocytophilum* összesített prevalenciája az *I. ricinus* nőtényekben 1,9% (264-ből 5, CI: 0,6–4,4%) volt. E kórokozó egész tavaszi kullancsszezonra vonatkozó legmagasabb fertőzöttségi szintjét erdei élőhelyen, a magas szarvas egyedsűrűséggel jellemezhető (vadászati) területen (4.3.4.1. ábra: 4-es élőhely) érte el: 8,6% (35-ből 3, CI: 1,8–23,1%). Ugyanakkor *A. phagocytophilum* PCR-pozitív kullancsok nem fordultak elő két élőhelyen (4.4.5.1. táblázat), ahol a 4-es élőhelyhez képest kisebb volt a szarvasok egyedsűrűsége (4.3.4.1. ábra: 2-es élőhely), vagy teljesen ki voltak zárva (4.3.4.1. ábra: 1-es élőhely) (a 2-es élőhely kb. 4 km-re van a 4-es élőhelytől, az 1-es pedig körül van zárva). Összességében, az *A. phagocytophilum* prevalenciája nem mutatott szignifikáns különbséget az autópálya két oldala között (4.4.5.1. táblázat).

A *R. helvetica* összesített prevalenciája 17,4% (264-ből 46, CI: 13,1–22,6%) volt. E kórokozó az *I. ricinus* nőtényekben egész tavaszi kullancsszezonra vonatkozó legmagasabb fertőzöttségi szintjét a ligetes 2-es élőhelyen érte el, és ez 31,4% (35-ből 11, CI: 16,9–49,3%) volt. A teljes vizsgálati periódust figyelembe véve, a *R. helvetica* prevalenciájában szignifikáns különbség mutatkozott két, egymáshoz viszonyítva távoli ligetes élőhelyen az autópálya azonos oldalán (4.3.4.1. ábra, 5-ös élőhely: 12,3% [73-ből 9, CI: 5,8–22,1%] vs. 2-es élőhely: 31,4% [35-ből 11, CI: 16,9–49,3%]), de az autópálya ellenkező oldalán lévő élőhelyek között nem volt ilyen. Azonban, ha a mintavételi alkalmakat egyenként tekintjük, többször is szignifikáns különbséget mértünk a *R. helvetica* előfordulási gyakoriságában: egyrészt két-két nagy (4 km) távolságra lévő élőhely között (4.3.4.1. ábra: 2-es élőhely vs. 4-es/5-ös élőhely), és úgyszintén egymáshoz közeli élőhelyek között, amelyek az autópálya ellentétes oldalán voltak (4.3.4.1. ábra: 1-es vs. 2-es élőhely; 5-ös vs. 8-as élőhely) (4.4.5.1. táblázat).

A *B. burgdorferi* s.l. összesített prevalenciája 26,9% (264-ből 71, CI: 21,6–32,7%) volt. E kórokozó egész tavaszi kullancsszezonra vonatkozó legmagasabb fertőzöttségi szintjét az 1-es élőhelyen – az egyik oldalon az autópályával, a másikon vadvédelmi kerítéssel határolt, így a szarvasok kizárásával jellemezhető erdős autópálya-pihenőben – érte el: ez 35,9% volt (64-ből 23, CI: 24,3–48,9%) (4.3.4.1. ábra). Másfelől, szintén a teljes vizsgálati periódust figyelembe véve, a *B. burgdorferi* s.l. legalacsonyabb prevalenciáját a 4-es élőhelyen, tehát az erdős vadászati területen mértük, mégpedig 8,6%-ot (35-ből 3, CI: 1,8–23,1%). Ezen túlmenően, valamennyi élőhely adatai alapján, a Lyme-kór okozójának egész tavaszi kullancsszezonra vonatkozó prevalenciája fordított arányban állt az *A. phagocytophilum* fajével, ami erősen szignifikáns összefüggés volt (Spearman rangkorreláció: $\rho = -0,97$, $P = 0,005$). Az egész vizsgálati periódusban, a *B. burgdorferi* s.l. összesített prevalencia értékei szignifikáns eltérést mutattak különféle élőhelyek között akár az autópálya azonos, akár átellenes oldalán, de ez utóbbiak esetében a szignifikancia szintje magasabb volt (4.4.5.1. táblázat).

4.4.5.1. táblázat. A kullancs közvetítette baktériumok prevalenciája mintagyűjtő helyenként és alkalmanként. A fehér háttérű mezők az autópályától délre eső élőhelyek adatait, míg a szürke árnyalatú mezők az attól északra lévő élőhelyek adatait tartalmazzák. A mintacsoportok, amelyek között (azonos időpontban, tehát oszlopban) szignifikáns különbség volt, fekete pöttyök jelzik, amit a nagyobb érték irányába lila (ha $0.05 > P > 0.01$) vagy piros (ha $0.01 > P$) nyíl köt össze.

Élőhely: sorszám és típus	<i>Ixodes ricinus</i>														
	április első fele			április második fele			május első fele			május második fele			$\Sigma(A1+A2+M1+M2)$		
	A. phag.	R. helv.	B. burg.	A. phag.	R. helv.	B. burg.	A. phag.	R. helv.	B. burg.	A. phag.	R. helv.	B. burg.	A. phag.	R. helv.	B. burg.
1. erdő	0/14	2/14	6/14	0/20	2/20	5/20	0/20	3/20	7/20	0/10	2/10	5/10	0/64	9/64	23/64
2. liget	0/9	0/9	2/9	0/8	5/8	3/8	0/12	3/12	6/12	0/6	3/6	1/6	0/35	11/35	12/35
4. erdő	0/10	3/10	2/10	2/9	0/9	0/9	0/2	1/2	0/2	1/14	3/14	1/14	3/35	7/35	3/35
5. liget	0/20	5/20	7/20	0/20	1/20	2/20	1/20	0/20	7/20	0/13	3/13	4/13	1/73	9/73	20/73
8. erdő	0/12	0/12	5/12	1/7	2/7	2/7	0/18	4/18	1/18	0/20	4/20	5/20	1/57	10/57	13/57
$\Sigma(1.+8.)$	0/26	2/26	11/26	1/27	4/27	7/27	0/38	7/38	8/38	0/30	6/30	10/30	1/121	19/121	36/121
$\Sigma(2.+4.+5.)$	0/39	8/39	11/39	2/37	6/37	5/37	1/34	4/34	13/34	1/33	9/33	6/33	4/143	27/143	35/143

Megbeszélés

Európában az *I. ricinus* minden bizonnyal a legfontosabb kullancsfaj azok közül, amelyek emberen is szívhatnak vért (Gray, 1991). Nőstényei (szemben a hímekkel) vért kell, hogy szívjanak (gazdára kell, hogy kapaszkodjanak) és a legvalószínűbben hordoznak stádiumok között (transstadialisan) átjutó kórokozókat (Overzier és mtsai, 2013), amilyen az *A. phagocytophilum* és a *B. burgdorferi* s.l. Ezen kívül a nőstényeket a legrelevánsabb megvizsgálni a petefészken keresztül (transovarialis) a következő generációra öröklődő kórokozókra, amit a *R. helvetica* példáz. Ennélfogva a 2016-os, autópálya menti felmérésben az öt élőhelyen (erdőben és ligetben) gyűjtött *I. ricinus* nőstényeket választottuk kullancs közvetítette baktériumok molekuláris vizsgálatára.

Az *I. ricinus* nőstényekben mért legmagasabb *A. phagocytophilum* prevalencia ahhoz az erdei élőhelyhez tartozott, ahol legnagyobb egyedsűrűségben voltak jelen nagyvadak (főleg szarvasok, de más szarvasfélék és vaddisznó is). Ez a megfigyelés valószínűleg azzal állhat összefüggésben, hogy a szarvasfélék és a vaddisznók fontos rezervoárjai az *A. phagocytophilum* fajnak (Stuen és mtsai, 2013). Ugyanezen rezervoárok alacsony számának illetve hiányának köszönhető, hogy nem találtunk e baktériumra PCR-pozitív kullancsot a 2-es és 1-es élőhelyeken. Összességében, a 2016-os, autópálya menti, tehát vidéki kullancs élőhelyeket célzó vizsgálatunkban az *A. phagocytophilum* prevalenciája (1,9%) szignifikánsan ($P = 0,0005$) alacsonyabb volt a mintegy 40 km-re lévő városi élőhelyekhez képest (8,8%: 4.4.3. fejezet). Részben ugyanez az alacsony prevalencia magyarázza, hogy e baktériumfaj esetében az autópálya két oldala közötti prevalencia különbségek nem voltak szignifikánsak.

Annak tükrében, hogy nem volt szignifikáns különbség a vonatkozó élőhelyek között, megállapítható, hogy a *R. helvetica* prevalenciája nem függött a szarvasok (vadak) magasabb vagy alacsonyabb egyedsűrűségétől. Ez egyrészt az *I. ricinus* rezervoár szerepével hozható összefüggésbe, amely kullancsfaj a legtöbb, ligetes-erdei biotópban megtalálható, így ubikviternek számít; másrészt a *R. helvetica* transovarialis átvitelének tulajdonítható, aminek köszönhetően e baktériumfaj a természetben gerinces gazda hiányában is fennmaradhat (Sprong és mtsai, 2009).

A Lyme-kórt okozó *B. burgdorferi* s.l. *I. ricinus* nőstényekben kimutatott legmagasabb prevalenciáját a szarvasok kizárásával létesült autópálya-pihenőben érte el, a legalacsonyabb prevalenciát a nagy szarvas egyedsűrűséggel jellemezhető vadászterületen (mindkettő erdős élőhely), míg az összes vizsgált biotópot figyelembe véve is erősen szignifikáns fordított arányosság volt e kórokozó kullancsokban mért gyakorisága és az *A. phagocytophilum* fajé között. Ezek a megfigyelések minden bizonnyal összefüggenek az adott élőhelyen jellemző szarvas egyedsűrűséggel. Mint a szakirodalomból ismert, a szarvasok hiánya kisebb (2,5 Ha alatti), körülzárt területen (ami az 1-es élőhelyre is igaz) megnöveli annak esélyét, hogy a kullancsok rágcsálókön vagy más kisemlősökön szívjanak vért (Perkins és mtsai, 2006), amelyek a *B. burgdorferi* s.l. legfontosabb rezervoárjai. Ez azután a kullancs közvetítette kórokozó (ez esetben borreliák) megnövekedett prevalenciájához vezet az ilyen kis, zárt területen (amely így ún. "kullancs közvetítette kórokozó hotspot" lesz: Perkins és mtsai, 2006), ahogy ezt jelen esetben az erdős autópálya-pihenő esetében igazoltuk. A hatás ennek ellenkezője lehet nagyobb területeken, ahol magas a szarvasok egyedsűrűsége (amit a szintén erdős, 4-es biotóp példáz), és a kullancs fejlődési stádiumok (például nymphák) jelentős hányada szarvasféléken táplálkozhat, amelyek nem rezervoárjai a borreliáknak (Telford és mtsai, 1988; Jaenson és Tälleklint, 1992).

Következésképpen megállapítható, hogy az egész tavaszi kullancsszezonra vonatkozó összesített prevalencia szempontjából nem volt szignifikáns különbség a hasonló vegetációjú (erdő, liget vagy rét), közeli, de autópálya által elválasztott kullancs élőhelyek között az *I. ricinus* közvetítette három fontos, zoonotikus baktériumfaj gyakoriságában. Ennek tükrében úgy tűnik, az autópályáknak mint mesterséges barriereknek e vonatkozásban nincs "drámai" hatása. Ez valószínűleg a kis emlősök és madarak "puffer hatásának" köszönhető, mert ezek akadálytalanul átjuthatnak egy autópályán, és az *I. ricinus* közvetítette baktériumok fontos rezervoárjai lehetnek (Sprong és mtsai, 2009; 4.5.1. fejezet). A helyzet azonban más volt egyes mintagyűjtési alkalmakkor, amelyek közelebb állnak a kullancsokkal való időszakos kontaktus kockázatainak valós becsléséhez (mert relevánsabbak a kullancs élőhelyek emberi jelenlétével kapcsolatban, ami többnyire nem folyamatos): ilyen esetekben

szignifikáns különbség mutatkozott az *I. ricinus* közvetítette baktériumok prevalenciája szempontjából egymástól távoli biotópok között éppúgy, mint egymáshoz közeleiek között, ha azokat autópálya választotta el. Ezen túlmenően, a *B. burgdorferi* s.l. egész vizsgálati periódus alatti prevalenciájában élőhelyek között megfigyelt különbségek szignifikancia szintje magasabbnak bizonyult, ha a szóban forgó élőhelyeket autópálya is elválasztotta. Ezek az eredmények azt példázzák, hogy az elkerített autópályák hozzájárulhatnak a kullancs közvetítette kórokozók prevalenciájának helyi különbségeihez. Ez a hatás legvalószínűbben az autópályák barrier szerepének tulajdonítható, mivel megakadályozzák a nagyvadak (leginkább gímszarvas) mozgását. Ezen kívül, mivel az úttest két oldalán található vadvédelmi kerítések teljesen körülveszik az erdős autópálya-pihenőket, ezek kizárják onnan a szarvasokat. Ennek következtében pedig a *B. burgdorferi* s.l. magasabb prevalenciát ér el *I. ricinus* kullancsokban (amint erre rámutattunk), és így megnő a Lyme-kór kockázata az ide látogató emberek és kutyáik számára.

4.5. Molekuláris bizonyíték kullancs közvetítette kórokozók jelenlétére új gazdafajokban vagy kullancsaikban

4.5.1. Madarak mint a *Rickettsia helvetica* rezervoárjai

Előzmények

A madarak szerepe régóta ismert kullancsok (és azokban foglalt kórokozók) terjesztésében. Kevesebb adat áll azonban rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a madarak fertőződnek is egyes kullancs közvetítette kórokozókkal, így rezervoárként a rajtuk vért szívó kullancsokat akár fertőzhetik is. Ezért vizsgálatunk fő célja az volt, hogy madarak vérmintáiból és a róluk gyűjtött kullancsokból megkíséreljünk kimutatni három olyan zoonótikus kórokozót (*Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*), amelyek – szakirodalmi adatok alapján – növekvő jelentőségűek (Sprong és mtsai, 2009; de la Fuente és mtsai, 2005; Jahfari és mtsai, 2012). Egyúttal összefüggést kerestünk a madarak kullancs fertőzöttsége, illetve a fajukra jellemző táplálkozási magasság és vonulási szokás között.

Molekuláris módszerek: C, E, Maurer és mtsai (2013)

Eredmények

A madarak kullancs fertőzöttsége

A vizsgálat során 1219 madarat fogtunk be. Közülük 16 madárfaj összesen 68 egyede bizonyult kullancs fertőzöttnek (4.5.1.1. táblázat). Az eltávolított 140 kullancs között az *Ixodes ricinus* faj volt túlnyomó többségben mind a fertőzött madarak, mind a kullancsok tekintetében. Nevezetesen, a 68 kullancs fertőzött madár közül 63 egyeden ez a faj volt, ami 92,6%-os prevalenciának felel meg (CI: 83,7-97,6%), és a 140 kullancs közül 121 e fajba tartozott, ami 86,4%-os abundanciát jelent (CI: 79,6-91,6%). Az *I. ricinus* fajt 42 lárva, 78 nympa és egy adult nőstény képviselte. Nyolc madárról ugyanakkor egy másik kullancsfaj, a *Haemaphysalis concinna* egyedeit gyűjtöttük: e fertőzöttség prevalenciája tehát 11,8%-nak bizonyult (CI: 5,2-21,9%). A *Ha. concinna* abundanciája (13 lárvával és öt nympával) 12,6% volt (CI: 7,8-19,6%). Négy madár egyszerre hordozta mindkét kullancsfajt. Egy sisegő fűzike (*Phylloscopus sibilatrix*) pedig hazánkban nem honos *Hyalomma* lárvával volt fertőzött.

A kullancs fertőzöttség prevalenciáját a madárfajok két kategóriája között hasonlítottuk össze: amelyek jellemzően a földről táplálkoznak, és amelyek rendszerint magasabbról (4.5.1.1. táblázat). Szignifikánsan ($P < 0,0001$) több madár hordozott kullancsot abban a csoportban, amelynek fajai jellemzően a földről táplálkoznak (prevalencia: $27/115 = 23,5\%$, CI: 16,1-32,3%), szemben azokkal, amelyek magasabbról (prevalencia: $41/771 = 5,3\%$, CI: 3,8-7,1%). A *Ha. concinna* lárvái és nympái ugyanakkor nem fordultak elő olyan madarakon, amelyek a földről táplálkoznak (4.5.1.1. táblázat), ami szignifikáns különbséget jelent az *I. ricinus* fajjal összehasonlítva akár a kullancs fertőzöttség prevalenciáját ($P = 0,018$), akár annak intenzitását nézzük (tehát a madarankénti összes kullancs számát; $P < 0,0001$) (4.5.1.1. táblázat).

A madárfajokat vonulási szokásuk (távolságuk) szerint összehasonlítva (4.5.1.1. táblázat), a kullancs fertőzöttség prevalenciája 41,7% (5/12, CI: 15,2-72,3%) volt a rezidens madárfajoknál és 25,3% (21/83, CI: 16,4-36%) a rövid távú vonulóknál. Ezen értékek szignifikánsan ($P < 0,003$) magasabbak a közép- és hosszú távú vonulók esetében számolt értékeknél ($13/464 = 2,8\%$ prevalencia, CI: 1,5-4,7%; illetve $29/327 = 8,9\%$ prevalencia, CI: 6-12,5%). A *Hyalomma* lárva egy hosszú távú vonuló fajon fordult elő (4.5.1.1. táblázat).

4.5.1.1. táblázat. A madarak kullancsfertőzöttsége fajuk jellemzői szerint.

Madárfaj rövidítése (kullancs fertőzött/mind)	jellemező táplálkozás (kullancs fertőzött/mind)	vonulási távolság (kullancs fertőzött/mind)	madáregyedek száma, amely ... fajt hordozott (kullancsok száma)				
			<i>Ixodes ricinus</i>		<i>Haemaphysalis concinna</i>		<i>Hyalomma sp.</i>
			lárva	nympha	lárva	nympha	lárva
LUS MEG (4/36)			2 (5)	4 (5)			
LUS LUS (1/7)		hosszú	1 (5)	1 (2)			
ANT TRI (1/1)		(6/44)	1 (1)	1 (4)			
ERI RUB (13/52)	földről (27/115)		7 (9)	8 (14)			
TUR PHI (2/6)		rövid	1 (3)	2 (5)			
TUR ILI (1/1)		(16/59)		1 (1)			
TUR MER (5/12)		rezidens (5/12)	2 (2)	4 (11)			
ACR SCI (15/129)			2 (3)	12 (14)	2 (2)	3 (4)	
ACR SCH (4/90)			2 (2)	2 (2)			
LOC LUS (1/26)		hosszú			1 (5)		
SYL COM (2/19)		(23/283)	1 (1)	2 (2)			
PHY SIB (1/19)	föld felett (41/771)						1 (1)
SYL ATR (12/372)		középtávú	6 (10)	8 (8)	1 (1)	1 (1)	
PHY COL (1/92)		(13/464)		1 (1)			
COC COC (2/18)		rövid		2 (2)			
PRU MOD (3/6)		(5/24)	1 (1)	3 (7)	1 (5)		

Kullancs közvetítette kórokozók DNS-e a madarak vérmintáiban

Vérmintákat gyűjtöttünk mind a 68 kullancs fertőzött, és további 60 (kullancsmentes) azonos fajú madárból. Ebből a 128 madárból hat (4,7% prevalencia, CI: 1,7-9,9%) PCR pozitív volt *Rickettsia helvetica* fajra, tehát öt vörösbegy (*Erithacus rubecula*) és egy erdei szürkebegy (*Prunella modularis*). A Ct értékek tartománya (33-40) alacsonytól közepes mértékű bacteriaemiára utalt. Egy további erdei szürkebegyben más rickettsiát mutattunk ki, amelynek fajtát a magas (41-es) Ct érték miatt nem tudtuk meghatározni. Minden rickettsia-pozitív madarat áprilisban fogtuk.

Egy szintén áprilisban fogott szőlőrigó (*Turdus iliacus*) vérmintája PCR pozitívnak bizonyult *Anaplasma phagocytophilum* fajra (Ct = 32,2). Ezen kívül még 25 madár hordozott nem azonosítható baktériumokat az Anaplasmataceae családból (Ct ≥ 31,4), de egyik sem volt pozitív *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* fajra.

Kullancs közvetítette kórokozók DNS-e a madarokról gyűjtött kullancsokban

Összességében, a 140 eltávolított kullancs közül 72 (51,4%, CI: 42,8-60%) volt rickettsia-pozitív: 61 tartalmazott *R. helvetica* DNS-t (43,6%, CI: 35,2-52,2%), és 11 tartalmazott *R. monacensis* DNS-t (7,9%, CI: 4-13,6%). *Rickettsia helvetica* fajt az *I. ricinus* és a *Ha. concinna* lárvák és nymphák is hordozták, de *R. monacensis* fajt csak az *I. ricinus* fejlődési stádiumaiból mutattunk ki. A rickettsia-pozitív *I. ricinus* lárvák (22/42: 52,4%) és nymphák (42/78: 53,8%) aránya hasonló volt. A 18 *Ha. concinna* példány közül hétben (három lárvában és négy nymphában) volt jelen a *R. helvetica* (38,9%, CI: 17,3-64,3%).

A hat *R. helvetica* PCR-pozitív madár közül négyen egyáltalán nem voltak kullancsok, és egy további PCR negatív kullancsot hordozott. A fennmaradó *R. helvetica* bacteriaemiás madáron 11 kullancs volt, amelyek közül kettő (egy *I. ricinus* nympha és egy *Ha. concinna* lárva) PCR pozitívnak bizonyult. Ugyanakkor, 38 *R. helvetica* PCR negatív madárról 59 *R. helvetica* PCR pozitív kullancsot gyűjtöttünk, amelyek között 17 *I. ricinus* és kettő *Ha. concinna* lárva is volt.

Az *A. phagocytophilum* specifikus PCR-ben csupán egy *I. ricinus* nympha (amelyet PCR negatív madárról távolítottunk el) lett pozitív. Épp ellenkezőleg, az *A. phagocytophilum* PCR pozitív madáron egy PCR negatív kullancs volt.

Megbeszélés

Madarak körében a kullancs fertőzöttség prevalenciája és intenzitása (éppúgy, mint a rájuk kapaszkodó kullancsok faja) számos háttér tényezőtől függhet. Ily módon, ezek a tényezők hatással vannak a madarak kullancs közvetítette betegségek szempontjából játszott rezervoár, illetve terjesztő szerepére.

E háttér tényezők egyike az adott madárfajra jellemző táplálkozási magasság. Vizsgálatunkban a kullancs fertőzöttség prevalenciája erősen összefüggött a madarak talajszinten való táplálkozásával, hasonlóan korábbi tanulmányok eredményeihez (Ishiguro és mtsai, 2000). Adataink azonban arra is rávilágítottak, hogy ezt az összefüggést jelentősen befolyásolhatja a kullancsok faja, minthogy a *Ha. concinna* fejlődési stádiumai kizárólag olyan madarakon fordultak elő, amelyek leginkább a föld felett, tehát magasabban táplálkoznak. Az itt megfigyelt, *Ha. concinna* és *I. ricinus* között mutatkozó különbség oka fejlődési stádiumaik eltérő gazdakeresési magassága lehet. Leírták ugyanis, hogy a *Haemaphysalis* nymphák aszerint foglalják el helyüket más-más magasságban a vegetáción, hogy az adott térségben milyen a szarvas populáció átlagos testmérete (Tsunoda és Tatsuzawa, 2004). Hasonlóképpen, vizsgálatunkban a *Ha. concinna* lárvák és nymphák valószínűleg azért fertőztek olyan madarakat, amelyek (faji szinten) előszeretettel táplálkoznak a talajszint felett, mivel e kullancsfaj preadult stádiumainak legkedveltebb gazdái hazánkban az őzek (Hornok és mtsai, 2012b). Másfelől, adatainkból az is kitűnik, hogy az *I. ricinus* lárvák és nymphák gazdakereső pozíciójukat a növényzet alacsonyabb szintjén foglalják el (mivel leginkább a földről táplálkozó madárfajokon fordultak elő), aminek hátterében eltérő gazdapreferenciájuk állhat, hiszen gazdaként a rágcsálókat részesítik előnyben (Rigó és mtsai, 2011).

Vizsgálatunk eredményei szerint a madarak vonulási távolsága jelentősen befolyásolhatja kullancs fertőzöttségüket, mind a prevalencia, mind pedig a faji összetétel szempontjából. Először is, a kullancs fertőzöttség prevalenciája szignifikánsan magasabb volt rezidens és rövid távon vonuló madárfajok körében, minden bizonnyal annak következtében, hogy ezek a fő kullancs szezon idején (kora tavasszal) jelen vannak, illetve akkor érkeznek meg (erre utalás történik itt is: Olsén és mtsai, 1995). Ezzel szemben azok a madárfajok, amelyek közép- vagy hosszú távú vonulók, május-június folyamán érkeznek hazánkba (Csörgő és mtsai, 2009), tehát a fő kullancsszezon végén vagy után (így kullancs fertőzöttségük kisebb lesz). A hosszú távú vonulók jelentősége inkább abban rejlik, hogy "egzotikus", Magyarországon nem honos kullancsfajokat hozhatnak magukkal a trópusi, szubtrópusi régióból, mint ezt már leírtuk (Hornok és mtsai, 2013a) és a vizsgálatunk során sisegő füzikéről eltávolított *Hyalomma* lárvá is példázza. Európában, a déli területekről északi országok felé induló madarak ugyanis mediterrán elterjedésű kullancsfajokat vihetnek magukkal (például kétgazdás *Hyalomma*-fajú egyedeket, amelyek lárvaként majd nymphaként egyhuzamban 12-26 napot is gazdájukon tölthetnek: Farkas és mtsai, 2003).

Vizsgálatunk legfontosabb eredménye a madarak *R. helvetica* bacteraemiájának molekuláris bizonyítéka. Egy korábbi tanulmány szerint, amikor 130 vadon élő madarat teszteltek rickettsiák jelenlétére, egyiket sem találták rickettsaemiásnak (Stańczak és mtsai, 2009). Egy másik felmérésben a 131 csoportban (*pool*) vizsgált madár vérmintából 3% PCR pozitív volt nem azonosított rickettsiákra (Ioannou és mtsai, 2009). Arról is rendelkezésre állnak adatok, hogy madarakban kísérletesen *R. rickettsii* és *R. canadensis* rickettsaemia váltható ki (Hasle, 2013; Burgdorfer, 1968). Összességében tehát, legjobb tudomásunk szerint, vizsgálatunk szolgáltatva az első molekuláris bizonyítékot a *R. helvetica* jelenlétére madarakban. Mindkét madárfaj, amelynek vérének PCR pozitívnak találtuk (vörösbegy, erdei szürkebegy), emberközeli (*synanthrop*) életmódjáról ismert (azaz városi és külvárosi élőhelyeik vannak: Csörgő és mtsai, 2009).

Mivel vizsgálatunkban nem voltak kullancsok a *R. helvetica* bacteraemiás madarak többségén, és egy további PCR pozitív madáron csak egy PCR negatív kullancs volt, ezen adatok azt sugallják, hogy a rickettsaemia tovább perzisztál az adott madárban a kullancs vektor leválását követően. Ugyanakkor, az egyik *R. helvetica* fertőzött madárról eltávolított 11 kullancs közül csupán kettő volt PCR pozitív. Ebből arra következtethetünk, hogy e rickettsiák madarakból *naïv* kullancs vektorba történő átjutása alacsony határfokkal történhet. Ismert, hogy a *R. rickettsii* bizonyos gerinces rezervoárok keringésében

kialakuló baktériumszintje elegendő kullancsok fertőzéséhez, míg más (szintén fogékony) gazdáiban a rickettsaemia túl alacsony ehhez (Bozeman és mtsai, 1967). Emellett alternatív magyarázatként szolgálhat, hogy egyes *Rickettsia*-fajoknál intermittáló rickettsaemiát írtak le (Kelly és mtsai, 1992).

Mindazonáltal, a vizsgálatunkban madarokról gyűjtött kullancsok több, mint fele (51,4%) PCR pozitív volt rickettsiákra, leginkább *R. helvetica* fajra. Ez a prevalencia szignifikánsan magasabb annál a fertőzöttségi szintnél, amit a növényzetről gyűjtött, gazdakereső kullancsok esetében jelentettek (rendszerint 4-16%, több ország adatai alapján: Sprong és mtsai, 2009). Hasonlóképpen, az itt, madarokról gyűjtött *Ha. concinna* fajú kullancsok körében talált PCR pozitívítás (18-ból hét egyed) is szignifikánsan ($P < 0,001$) magasabb volt annál a minimum és "pool" prevalenciánál, amit a hazánkban növényzetről gyűjtött példányoknál mértünk (53-ból egy "pool" volt pozitív: Hornok és mtsai, 2010). Vizsgálatunk ezen eredménye, tehát a *R. helvetica* magas prevalenciája preadult madárkullancsok esetében, többféle szóba jöhető okkal magyarázható. Először is, a lárvák PCR pozitívítása (különösen PCR negatív madáron) részben a *R. helvetica* transovarialis átvitelének tulajdonítható, ahogy ez ismert (Burgdorfer és mtsai, 1979). Másodsor, a preadult stádiumok vizsgálatunkban talált fertőzöttsége jelentősen nagyobb arányú a kifejlett kullancsok más tanulmányokban közölt adataihoz képest, ami a *R. helvetica* alacsony szintű transstadialis fennmaradására utalhat, jóllehet vizsgálatunk egyik eredménye, az *I. ricinus* és a *Ha. concinna* lárvák és nymphák hasonló fertőzöttségi aránya ellentmond ennek. Harmadrészt, egyes kullancsok az ún. együttláplálkozás (*co-feeding*) során is hozzájuthattak rickettsiákhoz (Hasle, 2013; Randolph és mtsai, 1996). Végül, de nem utolsó sorban egyes PCR negatív madárról gyűjtött PCR pozitív kullancsok madár gazdájukból is felvehették a *R. helvetica* fajt, mivel a vérvétel időpontjában tapasztalt PCR negativitás nem zárja ki hogy a kullancs vérszívásának korábbi napjain a madárban detektálható rickettsaemia lehetett.

A madarak rickettsia hordozásán kívül megállapítottuk, hogy egy szőlőrigó vérében *A. phagocytophilum* volt jelen. Szakirodalmi adatokat figyelembe véve ez lehet a második közvetlen bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a madarakban e zoonotikus kórokozó bacteriaemiája természetes úton kialakulhat, tehát a madarak szerepet játszhatnak a granulocytás anaplasmosis járványtanában. Az első tanulmányban, amely e lehetőséget felvetette (de la Fuente és mtsai, 2005) az *A. phagocytophilum* madarak körében mért prevalenciája (22%) jelentősen magasabb volt a hazánkban itt megfigyeltnél, de – hasonlóságképpen – értéke abban a fajban (feketerigó: *Turdus merula*) volt a legmagasabb, amelynek taxonómiai közeli rokonát (szőlőrigó: *T. iliacus*) vizsgálatunkban PCR pozitívnak találtuk. Másfelől, a szakirodalmi adatok ellentmondásosak annak megítélésében, hogy vajon a madarak vagy a kis emlősök játszanak-e fontosabb szerepet az *A. phagocytophilum* rezervoárjaként. Egy tanulmányban a madarokról eltávolított kullancsok szignifikánsan nagyobb arányban hordozták e kórokozót, mint a régóta ismert rezervoárokról, kis emlősökről eltávolítottak (Franke és mtsai, 2010). Ezzel szemben, egy másik felmérés (amely az *A. phagocytophilum* rezervoár kompetenciát különféle emlős és madár gazdákról gyűjtött kullancs lárvák molekuláris analízise alapján mérte fel) arra engedett következtetni, hogy a kis emlősök járványtani szempontból jelentősebbek a madarakhoz képest (Keesing és mtsai, 2012).

Csupán egy *A. phagocytophilum* pozitív kullancsot találtunk, mégpedig egy olyan madáron, amely a vonatkozó PCR-ben negatív lett. Ugyanakkor a PCR pozitív madáron talált kullancs is PCR negatívnak bizonyult. Mindez nem meglepő annak fényében, hogy az *A. phagocytophilum* prevalenciája még gazdakereső kullancsokban is gyakran nagyon alacsony (0,8%: Coipan és mtsai, 2013). Magyarországon például e zoonotikus kórokozót meg sem találták ismert rezervoárokról (kis emlősökről) gyűjtött nagyszámú kullancsban (Rigó és mtsai, 2011).

Noha a *Candidatus* *Neoehrlichia mikurensis* fajt kimutattuk ugyanannak a térségnek a kullancsaiban, ahol a madarak mintavétele is történt (4.7.6. fejezet), e zoonotikus kórokozóra nézve egy madár sem volt PCR pozitív. Mindazonáltal ez lehetett a *Ca. Neoehrlichia mikurensis* faj első felmérése olyan madarakban, amelyek ismert vektorát, az *I. ricinus* kullancsfajt relatíve nagy számban hordozták. Mivel vizsgálatunkban e baktériumfaj tesztelése multiplex PCR segítségével történt, ez a kimutatási rendszer azt is jelezte, hogy a madarak nagy számban pozitívak az Anaplasmataceae család

valamely képviselőjére vagy képviselőire. A fajt azonban nem tudtuk azonosítani a valószínűsíthetően alacsony fertőzöttségi szint miatt (amennyiben a magas Ct értékekből erre következtetünk). Ez a megfigyelés jól illeszkedik korábbi szakirodalmi adatokhoz, amelyek a madarak vérében *Anaplasma*-faj(ok) jelenlétét tanúsították (Ioannou és mtsai, 2009).

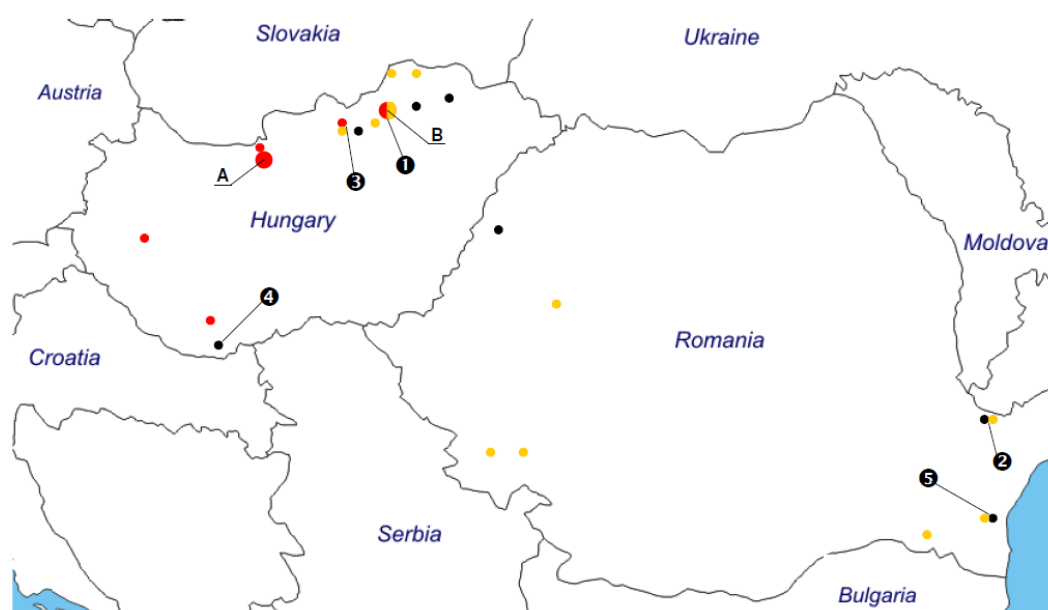
Következtetésképpen, ez a madarak *R. helvetica* fertőzöttségének első molekuláris bizonyítéka. Vizsgálatunk eredményei alapján a madarak mindkét, *I. ricinus* által közvetített zoonotikus kórokozó, a *R. helvetica* és az *A. phagocytophilum* potenciális rezervoárjai lehetnek, de az utóbbi szempontjából járványtani szerepük úgy tűnik, alacsonyabb (legalábbis Közép-Európában, illetve a vizsgált térségben). Adataink arra is utalnak, hogy a rickettsaemiás madaraktól akár az *I. ricinus*, akár a *Ha. concinna* kullancsfaj fertőződhet, de alacsony határfokkal.

4.5.2. Denevérek mint humán- és állategészségügyi szempontból jelentős piroplasmák feltételezett rezervoárjai: kullancsvizsgálat

Előzmények

Három, denevéreken élősködő kullancsfaj (Acari: Ixodidae) ismert Európában: az *Ixodes vespertilionis*, az *I. ariadnae* és az *I. simplex* (Hornok, 2017a; 2017b; 2017c). Ezek specifikus gazdái denevérek, tehát mindhárom fejlődési stádiumnak, amelynek vért kell szívnia (a lárvának és a nymphának a vedléshez, a nősténynek a peterakáshoz) szinte kizárólag denevéren élősködik (Hornok, 2017a; 2017b; 2017c). Noha e három kullancsfaj a Palearktikumban széles körben elterjedt (4.8.1. fejezet), hiányosak az adatok az általuk közvetíthető kórokozókról. A denevérek kullancsok kórokozó-kimutatás céljából végzett molekuláris vizsgálatai eddig mindössze bartonellákat mutattak ki *I. vespertilionis* fajból (4.4.2. fejezet), de – legjobb tudomásunk szerint – hasonló közlemények nincsenek sem az *I. simplex*, sem az *I. ariadnae* fajokról. Ezért kezdtünk jelen vizsgálatunkba, hogy kiegészítsük a denevérek kullancsok által hordozott kórokozó DNS-re vonatkozó hiányos irodalmi adatokat. Előzőleg *Babesia canis* DNS-t mutattunk ki denevérek ürülékében (4.5.3. fejezet), így kórokozó célcsoportnak a piroplasmákat választottuk. Munkánkban arra is lehetőség nyílt, hogy megvizsgáljuk e kullancsok földrajzi elterjedtségét és gazdaspektrumát Magyarországon és Romániában, mivel három családon belül hat nembe tartozó 17 denevérfajról sikerült kullancsokat gyűjteni.

Molekuláris módszer: K



4.5.2.1. ábra (előző oldal). Mintagyűjtési helyek kullancsfajonként. Az *Ixodes ariadnae* lokalizációját piros, az *I. vespertilionis* fajét sárga, az *I. simplex* fajét pedig fekete körök jelölik. Betűk: A – Ariadne-barlangrendszer és pilisi barlangok (denevérfogás három barlangnál); B – Bükki fensík barlangjai (denevérfogás kilenc barlangnál). A fekete körben lévő sorszámok azon helyeket jelölik, ahonnan piroplasma-hordozó kullancsot azonosítottunk (4.5.2.2. táblázat). A kicsi, eltérő színű, összeérő pöttyök azonos helyen előforduló két kullancsfajt jelölnek. Két egymáshoz közeli helyet (Baradla- és Béke-barlang) Északkelet-Magyarországon egy pötty jelöl (koordináták az eredeti közleményben).

Eredmények

A két országban összesen 308 kullancsot gyűjtöttünk 17 denevérfaj 200 egyedéről (4.5.2.1. táblázat). Az *I. ariadnae* fajt 45, az *I. vespertilionis* fajt 124, és az *I. simplex* fajt 139 példány képviselte (lárvák, nymphák és nőtények). Hazánkban az *I. ariadnae* faj szignifikánsan gyakrabban fordult elő a Vespertilionidae család denevérfajain, míg az *I. vespertilionis* a Rhinolophidae családdal társult ($P < 0,00001$). Az *I. ariadnae* faj nem került elő Romániából, ahol az *I. vespertilionis* rendszerint a Vespertilionidae és Rhinolophidae család képviselőin egyaránt előfordult (4.5.2.1.B táblázat). Egy lárv kivételével (ami *Barbastella barbastellus* denevérfajon táplálkozott) az *I. simplex* csak *Miniopterus schreibersii* fajról volt gyűjthető. Általánosságban, nem volt jelentős eltérés az egyes denevérfajok kullancs-fertőzöttségének intenzitásában ($P = 0,4279$, $df = 5$, $\chi^2 = 4,9026$), de szignifikáns különbség mutatkozott a fertőzöttség intenzitásában a kullancs fejlődési stádiumok szempontjából (lárva: $n = 155$; nympa: $n = 79$; nőtény: $n = 13$; $P = 0,0005$, $df = 2$, $\chi^2 = 14,924$), tehát a kullancslárvák fordultak elő legnagyobb egyedszámban denevér gazdáikon. Az *I. ariadnae* és az *I. vespertilionis* estében nem volt szignifikáns fertőzöttség intenzitásbeli különbség az egyes denevérfajok között, vagyis a *Myotis bechsteinii* és a *My. emarginatus* ($P = 0,4497$, $W = 28$) vagy a *My. daubentonii*, *Rhinolophus ferrumequinum* és *R. hipposideros* ($P = 0,8719$, $df = 2$, $\chi^2 = 0,27423$) között (4.5.2.1. táblázat). Hasonlóképpen, ezen öt denevérfaj esetében nem volt szignifikáns különbség az egyes kullancs fejlődési stádiumokkal való fertőzöttségük intenzitásában, kivéve a *My. daubentonii* és a *R. ferrumequinum* fajokat, amelyekben a lárvák gyakrabban fordultak elő a nymphákhoz és nőtényekhez képest ($P = 0,02013$, $df = 2$, $\chi^2 = 7,8106$). Ugyanígy, a *Mi. schreibersii* denevérfaj *I. simplex* kullancsfajjal való fertőzöttsége a lárvák esetében érte el legmagasabb intenzitását (lárva: $n = 79$; nympa: $n = 50$; nőtény: $n = 9$; $P = 0,001674$, $df = 2$, $\chi^2 = 12,786$).

4.5.2.1. táblázat. A gyűjtött kullancsfajok és stádiumaik denevér gazdájuk faja és családja szerint: (A) Magyarország, (B) Románia. Öt nőtény és két nympa stádiumú *I. ariadnae* (amelyeket barlangfalról gyűjtöttünk) nem szerepel a táblázatban. Rövidítések: st – stádium, *I.a.* – *Ixodes ariadnae*, *I.v.* – *I. vespertilionis*, *I.s.* – *I. simplex*, L – lárva, N – nympa, F – nőtény.

(A)		Denevér taxon (kullancsok száma / denevérek száma)											
Kullancs		Vespertilionidae								Rhinolophidae		Miniopteridae	
faj	st.	MALC	MBEC	MNAT	MEMA	MDAU	MDAS	MMYO	PAUR	BBAR	RHIP	REUR	MSCH
<i>I.a.</i>	L	4/2	3/3	1/1	6/6	5/3	5/2	-	1/1	-	1/1	-	-
	N	-	4/4	-	4/3	-	-	1/1	3/3	-	-	-	-
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>I.v.</i>	L	-	1/1	-	-	-	-	-	1/1	-	8/7	-	-
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6/4	-	-
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/1	1/1	-
<i>I.s.</i>	L	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	23/10
	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11/10
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/4

(B)		Denevér taxon (kullancsok száma / denevérek száma)								
Kullancs		Vespertilionidae			Rhinolophidae			Miniopteridae		
faj	st.	MNAT	MCAP	MDAU	MBLY	ESER	REUR	RFER	RMEH	MSCH
	L	1/1	9/1	28/16	4/1	2/2	-	26/9	7/4	1/1
I.v.	N	-	4/2	9/8	2/2	-	-	6/6	-	1/1
	F	-	1/1	1/1	-	1/1	1/1	1/1	-	-
	L	-	-	-	-	-	-	-	-	56/33
I.s.	N	-	-	-	-	-	-	-	-	39/33
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	5/5

Piroplasma DNS szekvenciákat 20 denevérekullancsból sikerült nyernünk (4.5.2.2. táblázat). Az *I. simplex* kullancsfaj szignifikánsan gyakrabban hordozott piroplasma DNS-t (138 mintából 13), mint az *I. vespertilionis* (124 mintából 3) ($P = 0,02$). A *Babesia* és *Theileria* DNS szekvenciák legnagyobb diverzitása (a legtöbb kimutatott faj) is az *I. simplex* kullancsfajban fordult elő (4.5.2.2. táblázat). Az *I. ariadnae* kullancsfajban ugyanakkor csak a *Babesia vesperuginis* DNS-e volt jelen (448/448 bp = 100% azonossággal). Mind a négy PCR-pozitív lárva ugyanarról a gazdaegyedről származott. Az *I. vespertilionis* lárváiban a *B. vesperuginis* (448/448 bp = 100% azonossággal) mellett a *B. crassa* egy genetikai változatát (404/410 bp = 98,5% azonosság) mutattuk ki (4.5.2.2. táblázat).

Az *I. simplex* nymphákban ez utóbbi előfordulásán kívül egy további, új *B. crassa* genotípust is igazoltunk (403/410 = 98,3% azonosság), amelyet korábban Magyarországon még nem mutattunk ki (4.5.2.2. táblázat). Ugyancsak *I. simplex* fajból a zoonótikus *B. venatorum* egy rövidebb szekvenciáját is felerősítettük (105/105 bp = 100% azonosság), amely más piroplasmákkal kisebb fokú hasonlóságot mutatott (a második-harmadik legközelebbi faj a *B. occultans* és a *T. equi* voltak, 103/105 bp = 98,1% azonossággal). Az *I. simplex* lárvákban/nymphákban a *B. canis* két szekvenciáját mutattuk ki (az azonosság mindkét esetben 420/420 bp = 100% volt). A szekvenálás eredményei – kizárólag *I. simplex* lárvákban – két *Theileria*-faj DNS-ének jelenlétét is igazolták. Ezek a *T. capreoli* (423/425 bp = 99,5% azonosság) és a *T. orientalis* (432/432 bp = 100% azonosság) voltak. A fentiekén kívül egy nőstény *I. simplex* példányban a *Theileria* sp. OT3 (432/432 bp = 100% azonosság) szekvenciája is kimutatható volt (4.5.2.2. táblázat).

A filogenetikai vizsgálatban a denevérekullancsokból felerősített valamennyi *Babesia*- és *Theileria*-faj a konspecifikus genotípusokkal csoportosult, amelyek a GénBankban hozzáférhetőek és amelyeket e piroplasmák korábban ismert tipikus gazdáiból mutattak ki (4.5.2.2. ábra). A denevérekullancsokban előforduló fajok más piroplasmáktól való elkülönülését magas *bootstrap* értékek jellemezték.

Mindent egybevetve, denevérekullancsokban előforduló piroplasma DNS-t hazánk három, illetve Románia két helyéről mutattunk ki (4.5.2.2. táblázat; 4.5.2.1. ábra). Három piroplasma genotípust illetve szekvenciát csak magyarországi mintákban találtunk meg, három másikat csak Romániában, míg további hármat mindkét országban (4.5.2.2. ábra).

Megbeszélés

E vizsgálatban mindhárom kullancsfaj szerepelt, amely denevér gazdákra specializálódott Európában. Közülük az *I. ariadnae* Közép- és Nyugat-Európa három országából ismert (Magyarország, Németország és Belgium: 4.6.1-2. fejezet), míg az *I. vespertilionis* és az *I. simplex* szélesebb körben elterjedt kontinensünkön (ez utóbbi jellemzően a 49° északi szélességtől délre: Hutson és mtsai, 2008). Munkánk során az *I. ariadnae* fajt nem találtuk meg Romániában, ami arra utal, hogy ott a denevérekullancs fauna a Balkán többi térségéhez hasonló, az *I. simplex* dominanciájával (Burazerović és mtsai, 2015). E jelenség egyik lehetséges magyarázata az, hogy hazánk és Románia hegyvidéki területei között nincs rendszeres denevérvándorlás, ami az *I. ariadnae* délkelet felé való terjedését eredményezhette volna (a térségre jellemző hosszú távú denevérvándorlás fő útvonala inkább délnyugat-északkelet irányú: Hutterer és mtsai, 2005).

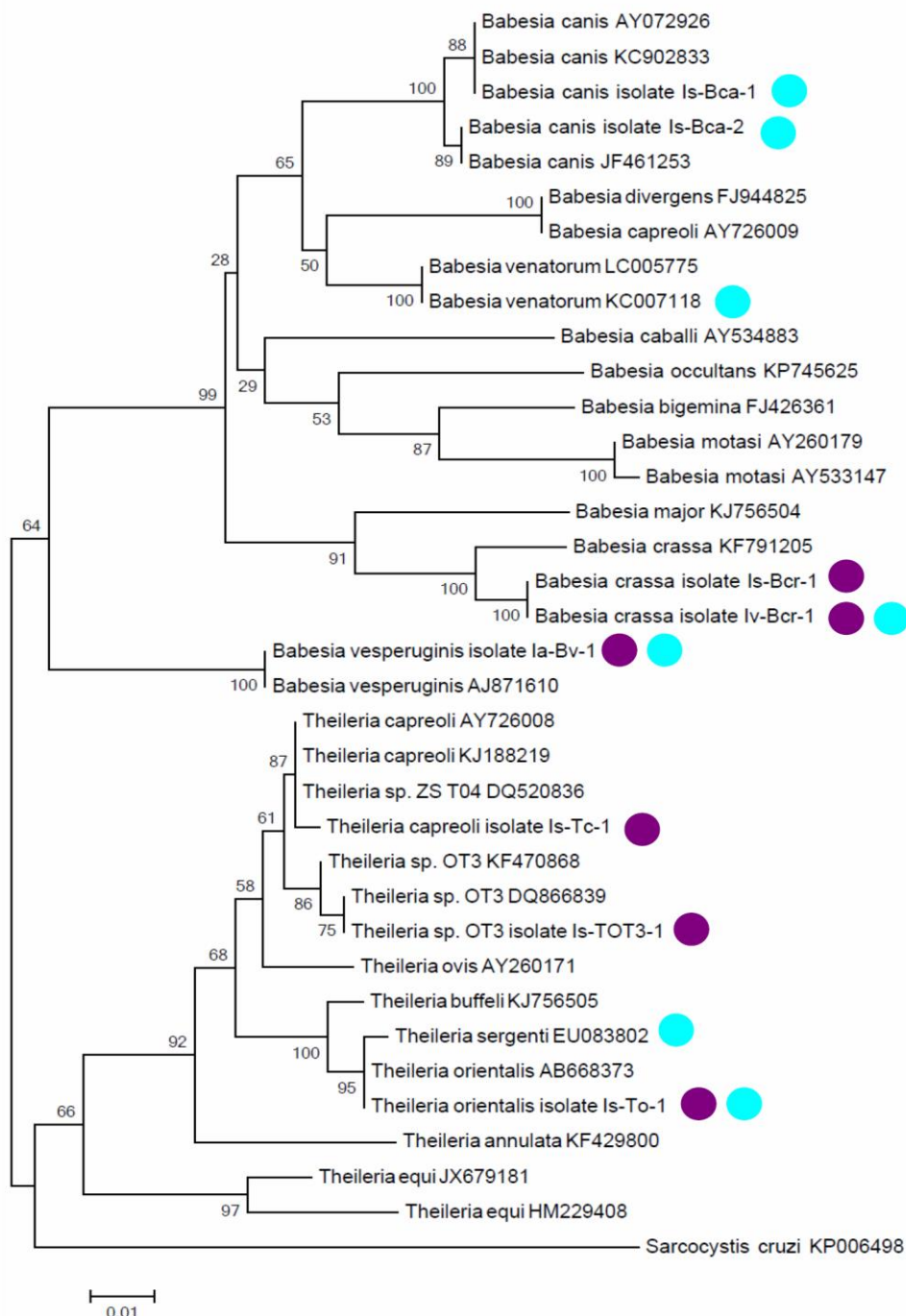
4.5.2.2. táblázat. A piroplasmák molekuláris vizsgálatának eredményei (rövidítések: előző táblázat).

Kullancs faj	st.	PCR+ / összes	Kapott szekvencia (hossz, % azonosság, mintaszám)	denevérfaj PCR pozitív kullancssal	Gyűjtő-hely (ábra)	Referencia szekvencia	Génbanki szám (izolátum)
I.a.	L	4/26	<i>Babesia vesperuginis</i> (448 bp, 100%, 4×)	MDAS	❶	AJ871610	KU958544 (Ia-Bv-1)
	N	0/14	-	-	-	-	-
	F	0/5	-	-	-	-	-
I.v.	L	3/89	<i>Babesia vesperuginis</i> (448 bp, 100%, 2×)	ESER, MDAU	❷	AJ871610	KU958544 (Ia-Bv-1)
			<i>Babesia crassa</i> (410 bp, 98,5%, 1×)	RHIP	❸	KF791205	KU958546 (Iv-Bcr-1)
	N	0/27	-	-	-	-	-
	F	0/8	-	-	-	-	-
I.s.	L	8/79	<i>Babesia crassa</i> (410 bp, 98,3%, 1×)	MSCH	❹	KF791205	KU958545 (Is-Bcr-1)
			<i>Babesia venatorum</i> (105 bp, 100%, 1×)	MSCH	❷	KC007118	KU958553 (Is-Bv-1)
			<i>Babesia canis</i> (420 bp, 100%, 1×)	MSCH	❷	JF461253	KU958552 (Is-Bca-2)
			<i>Theileria capreoli</i> (425 bp, 99,5%, 1×)	MSCH	❹	KJ188219	KU958547 (Is-Tc-1)
			<i>Theileria orientalis</i> (432 bp, 100%, 4×)	MSCH	❷ ❹ ❺	AB668373	KU958549 (Is-To-1)
	N	4/50	<i>Babesia crassa</i> (410 bp, 98,5%, 1×)	MSCH	❷	KF791205	KU958546 (Iv-Bcr-1)
			<i>Babesia canis</i> (420 bp, 100%, 1×)	MSCH	❷	KC902833	KU958551 (Is-Bca-1)
			<i>Babesia canis</i> (420 bp, 100%, 2×)	MSCH	❷	JF461253	KU958552 (Is-Bca-2)
	F	1/9	<i>Theileria</i> sp. OT3 (432 bp, 100%, 1×)	MSCH	❹	DQ866839	KU958550 (Is-TOT3-1)

Ezen vizsgálatunk eredményei megerősítették, hogy az *I. ariadnae* kullancsfaj legkedveltebb gazdája a Vespertilionidae családba tartoznak (4.1.1., 4.6.2. fejezet), az *I. vespertilionis* gazdája a Rhinolophidae családba, míg az *I. simplex* faj a *Mi. schreibersii* (Miniopteridae) specifikus parazitája (Arthur, 1956). Mindazonáltal, több – legjobb tudomásunk szerint eddig nem ismert – kullancs és denevér gazdafaj társulást is megállapíthattunk: az *I. ariadnae* újonnan került elő négy *Myotis*-fajról, az *I. vespertilionis* két *Myotis*-fajról és *Eptesicus serotinus* valamint *Rhinolophus mehelyi* fajokról, végül az *I. simplex* kullancsfaj *Barbastella barbastellus* denevérfajról.

A kullancs fertőzöttség intenzitása nem különbözött szignifikánsan a kisebb és nagyobb testű denevérfajok között (*My. daubentonii* vs. *R. ferrumequinum*), ami arra utalhat, hogy a testmérettől függő paraméterek (mint a testfelület mérete, ami összefügg az anyagcsereszinttel, hőkibocsátással: Hock, 1951) nem számítottak kritikusan fontos tényezőnek a szóban forgó kullancsok gazdára találásában. Hasonlóképpen, azt is megfigyeltük, hogy az énekesmadarak kategória szerint vett testmérete (kisebb vs. nagyobb) nem befolyásolták jelentősen kullancs fertőzöttségük intenzitását (4.2.1. fejezet). Másfelől, a kullancs lárvákkal való fertőzöttség intenzitása szignifikánsan nagyobb volt, mint a fejlődésmentes későbbi résztvevőié. Ez az eredmény azzal magyarázható, hogy a kullancs fejlődési stádiumok egyedszáma jelentősen csökken az életciklus előrehaladtával (Korotkov, 2004).

4.5.2.2. ábra. A vizsgálatban azonosított piroplasmák 18S rNS szekvenciái és releváns génbanki szekvenciák filogenetikai viszonyai. A hazánkban azonosított genotípusokat lila, míg a romániaiakat kék pötty jelöli. A denevérkullancsból kimutatott *Babesia venatorum* szekvenciája (rövidségénél fogva) nem szerepel a fán, így referencia szekvenciáját jelöltük meg, amellyel 100%-os azonosságot mutatott.



Figyelembe véve a denevérkullancsok vektorszerepével kapcsolatos irodalmi adatok szinte teljes hiányát, és hogy előzőleg *B. canis* DNS-t mutattunk ki denevérürülékből (4.5.3. fejezet), itt 307 denevérekullancs DNS mintáját vizsgáltuk molekulárisan piroplasmák (Apicomplexa: Piroplasmida) jelenlétére. A piroplasmák közül a babesiákat (*sensu stricto*) a nőstény kullancsok képesek trans-ovarialisán, a következő kullancs generáció(k)nak átadni (tehát babesiák a kullancs lárvákban már a vérszívás előtt is előfordulhatnak), míg a theileriákra (*sensu stricto*) az adott kullancs fejlődési stádium (lárva, nympa) általi fertőződés és a theileriák következő stádiumra (nympa, adult) való –

transstadialis – átvitele és ezt követő beoltása jellemző (Fujisaki és mtsai, 1994). Ez utóbbi azt is jelenti, hogy nincs más módja egy kullancslárvának, hogy theileriával fertőződjön vagy annak DNS-ét tartalmazza, mint hogy felvegye azt a vérrel mint táplálékkal egy gazdából/rezervoárból, amely tehát vagy theileria-fertőzött, vagy legalábbis theileria DNS van a vérében.

A *B. vesperuginis* faj DNS-ét az *I. ariadnae* és az *I. vespertilionis* kullancsfajokban is kimutattuk. E piroplasma kórokozóképes denevérekben, és fertőzhet *Pipistrellus pipistrellus*, több *Myotis* (köztük a *My. daubentonii*, amelynek példányán egy PCR-pozitív kullancsot találtunk) és *Plecotus auritus* denevérfajokat (Sebek és mtsai, 1975). Figyelembe véve, hogy a *B. vesperuginis* feltételezett vektorai denevéróvantagok (*Argas vespertilionis*) (Gardner és Molyneux, 1987), itt leírt eredményeink szerint a PCR-pozitív kullancsok táplálékukkal, a vérrel juthattak e piroplasmához vagy DNS-éhez, aminek alapján feltételezhető, hogy további *Myotis*-fajok (így a *My. dasycneme*) és az *Eptesicus serotinus* is fogékony lehet e kórokozóra.

A *B. crassa* alacsony patogenitású kiskérődzőkben, és vektora ismeretlen (Hashemi-Fesharki és Uilenberg, 1981). Korábban úgy tartották, hogy e piroplasma (vagy hozzá közeli genotípusok) csak a Közel-Kelet térségében fordulnak elő, de nemrég egyik genetikai változatát sikerült azonosítanunk *Haemaphysalis inermis* kullancsfajban Közép-Európában, Magyarországon (4.7.13. fejezet). Jelen vizsgálatunkban a *B. crassa* két genotípusát is kimutattuk denevérkullancsokban (*I. vespertilionis*, *I. simplex*) hazánkban és Romániában is. E két denevérkullancs-fajt sohasem írták le kiskérődzőkről mint gazdákról, ezért PCR pozitivitásuk legvalószínűbben a *B. crassa* DNS-ét tartalmazó vér felvételével magyarázható denevérből. Ebben az összefüggésben – járványtani szempontból – releváns lehet, hogy a *B. crassa* előfordul *Ha. sulcata* kullancsfajban (Aktas, 2014), és e kullancsfajról leírták, hogy lárva stádiumban denevéreket, adultként pedig kiskérődzőket is fertőzhet (Filippova és mtsai, 1976).

A *B. canis* a kutyák fontos parazitája. Vadon élő canidák is fogékonyak (Kuttler, 1988). E piroplasma ismert vektora a *Dermacentor reticulatus* kullancsfaj, ami ritkán ugyan, de előfordul denevéreken, köztük a *Mi. schreibersii* fajon (Neuman, 1911). Nemrég írtuk le, hogy a denevérek ürülékében *B. canis* DNS lehet jelen (4.5.3. fejezet). Figyelembe véve, hogy az *I. simplex* itt PCR-pozitívnak talált egyedei kutyáktól nem fertőződhetek vagy vehették fel a DNS-t (amely gazdafajról az *I. simplex* kullancsfajt sohasem jelentették) sem előző stádiumukban, sem előző generációjuk során, a *B. canis* fajt vagy DNS-ét eredetileg feltételezhetően e PCR-pozitív kullancsok denevér gazdája hordozhatta vérében. Ezt a lehetőséget támasztja alá az is, hogy nemrég igazolást nyert a *B. canis* DNS előfordulása denevér szövetekben (Corduneanu és mtsai, 2016).

Érdekes eredmény a zoonótikus *B. venatorum* DNS-ének kimutatása (rövidebb, de specifikus szekvenciájának felerősítése) egy romániai eredetű *I. simplex* lárvából. Bár a szekvencia csak a *B. venatorum* fajjal mutatott azonosságot és különbözött más piroplasmáktól, rövidegénél fogva nem vonható le végleges következtetés e faj DNS-ének denevérkullancsokban való előfordulásáról. Ugyanakkor ezt a vizsgálati eredményünket később megerősítette egy angliai lelet, ahol olyan szekvenciát nyertek denevéróvantagból, amely legközelebb a *B. venatorum* fajhoz állt (Lv és mtsai, 2018). Ennek a piroplasmának a szarvasfélék (*Cervidae*) a gazdái, de emberben is megtelepszik, az *I. ricinus* lévén a vektora. Ezzel összefüggésben fontos megjegyezni, hogy az *I. ricinus* előfordul denevéreken (például: Ševčík és mtsai, 2010), és eredményünk azt sugallja, hogy ezáltal bekerülhet a *B. venatorum* vagy legalább a DNS-e egyes denevérekbe (azt is figyelembe véve, hogy az *I. simplex* fajt sohasem jelentették szarvasfélékről vagy emberről, így az itt pozitívnak talált lárvák ezekből a forrásokból nem fertőződhetett). Másfelől, az *I. simplex* kullancsfaj specifikus gazdája, a *Mi. schreibersii* nagy telepekben is élhet az ember közelében (például bányákban, alagutakban, romokban: Hutson és mtsai, 2008). Ezért az itt elért előzetes eredmény további molekuláris járványtani vizsgálatot érdemel.

A *Theileria*-fajok és genotípusok közül, a *Theileria* sp. OT3 DNS-ét egy *I. simplex* nőtényből mutattuk ki. Ezt a piroplasmát (amelynek patogenitása nem ismert) korábban olaszországi kiskérődzőkben okozott fertőzés vizsgálata során írták le (Giangaspero és mtsai, 2015), de azt követően a DNS-ét Észak-Magyarországon is kimutattuk *Haemaphysalis punctata* kullancsfajból (Hornok és mtsai, 2015b), amelyről ismert, hogy denevéreket is fertőz (Estrada-Peña, 1989). Ezen felül, két további *Theileria*-faj DNS-ét mutattuk ki *Mi. schreibersii* denevérről származó *I. simplex* lárvákban. Közülük a *T. capreoli* a szarvasfélék kevésbé patogén élősködője. A *H. concinna* kullancsfaj, amelyben a *T. capreoli*

DNS-t nemrég hazánkban azonosítottuk (Hornok és mtsai, 2015b), szintén fertőzhet denevéreket (Lebedeva és Korenberg, 1981).

A *T. orientalis* fajkomplex tagjai, a *T. orientalis* és a *T. buffeli* (többek között) szarvasmarhákat fertőznek a trópusi-szubtrópusi régiókban, rendszerint alacsony pathogenitással. Az elmúlt években beszámoltunk felbukkanásukról Közép-Európában (4.7.16-17. fejezet), és azt megelőzően leírták a *T. orientalis* növekvő jelentőségét Ausztráliában is (Kamau és mtsai, 2011), ahol esetenként súlyos fertőzöttséget okoz szarvasmarhákban (Izzo és mtsai, 2010). A *T. orientalis* fajkomplex vektorai a *Haemaphysalis* kullancs nemből kerülnek ki (Fujisaki és mtsai, 1994). A *Haemaphysalis*-fajokról ismert, hogy ritkán denevéreket is fertőzhetnek, sőt a *H. punctata* kullancsfajt, a *T. orientalis* legvalószínűbb európai vektorát, szinonim elnevezéssel "*H. rhinolophi*"-nak is hívták (Estrada-Peña, 1989). Továbbá, Délkelet-Ázsiában (ahol a *T. orientalis* fajkomplex nagyon elterjedt) legalább egy *Haemaphysalis* nembe tartozó kullancsfajnak denevérek a kedvelt gazdái (Hoogstraal, 1964). Ezek a szakirodalmi adatok arra engednek következtetni, hogy a nagykérődzők és a denevérek között lehetséges a kapcsolat *Haemaphysalis*-fajú kullancsok révén. Jelen vizsgálatunkban a denevérek kullancsoknak (*I. simplex*) csak a lárvái voltak PCR pozitívak és hordozták a *T. capreoli* és a *T. orientalis* DNS-ét. Ez azt jelenti, hogy a szóban forgó piroplasmákat (vagy legalább a DNS molekulákat) ezek a lárvák kizárólag denevér gazdáik véréből vehették fel, mivel a *sensu stricto* *Theileria*-fajoknál nincs transovarialis, csak transstadialis átvitel (Fujisaki és mtsai, 1994). A nagykérődzők theileriosisisa szempontjából a denevérek potenciális járványtani szerepének jelentőségét azért is indokolt tovább vizsgálni, mert több denevérfajról ismert, hogy használhatnak pihenőhelyként szarvasmarha istállót (például: Dekker és mtsai, 2013).

Összefoglalásképpen, a fenti piroplasmákat eddig denevérekből nem mutatták ki, csak más gazdákból. Ismert, kompetens vektoraik a *D. reticulatus*, *I. ricinus* és *Haemaphysalis*-fajok. Ezek a kullancsfajok csak ritkán fordulnak elő denevéreken, és valószínűleg akkor kapaszkodnak fel denevérekre, amikor azok kis emlősök búvóhelyén (például faodvakban) pihennek (4.5.3. fejezet), vagy a földről is táplálkozó denevérfajok a rétek, erdők aljnövényzetéről esznek rovarokat. Azonban a *Mi. schreibersii*, amely faj kullancsaiból e vizsgálatban a legtöbb piroplasmát kimutattuk, nem táplálkozik a föld szintjéről (Vincent és mtsai, 2011). Éppen ezért alternatív magyarázatként szolgálhat, hogy vérszívó legyek is hordozhatnak, sőt át is vihetnek egyik gazdáról a másikra *Babesia*- (Friedhoff, 1988) és *Theileria*-fajokat (Hammer és mtsai, 2016), és a legyek (Insecta: Diptera: Muscidae stb.) számos denevérfaj, köztük a *Mi. schreibersii* táplálékának gyakori elemei (Presetnik és Aulagnier, 2013). Ebből fakadóan a denevérek kapcsolatba kerülhetnek különféle piroplasmákkal vagy DNS-ükkel, illetve hozzájuthatnak ezekhez táplálékukból.

Ily módon, kétféle magyarázata is lehetséges a fenti, váratlan eredményeknek. Az első, hogy a denevérek gyakran felveszik azon vektor közvetítette kórokozók DNS-ét, amelyek rovar/ízeltlábú táplálékukban jelen vannak. Az emésztés során ez a DNS átjuthat a bélfal barrierjén (részben) emésztetlenül, és így megjelenhet a keringésben vagy talán a véren kívül más szövetekben is, ahonnan azután a denevéren vért szívó kullancsok felvehetik. E lehetőség mellett szól, hogy nemrég hazai szerzők igazolták: táplálék eredetű DNS szakaszok (akár hosszúak is) a bélben elkerülhetik a lebomlást, és eddig ismeretlen mechanizmusok révén átjuthatnak a keringésbe, legalább is az emberben (Spisák és mtsai, 2013).

A második, jóllehet kevésbé valószínű magyarázat, hogy a denevérek a piroplasmák szélesebb körére fogékonyak, mint azt előzőleg feltételezték. Mint nemrég (filogenetikai vizsgálatok alapján) kimutatták, a piroplasmák törzspejlődése a gazdafajok jelentős diverzitását és – a korábbi állásponttal szemben – limitált gazdaspecificitást tükröz (Lack és mtsai, 2012), ami arra utal, hogy e kullancs közvetítette egysejtűek evolúciójuk során gyakran váltottak gazdát. Ebben az összefüggésben itt vázolt eredményeink szerint a denevérek az emlősök széles körével (tehát más rendjeivel is) osztozhatnak piroplasmákon. Hasonlóképpen, ismert, hogy több *Babesia*- és *Theileria*-faj különféle emlős rendekből származó gazdát is fertőz (például: *B. caballii*, *B. canis*, *B. divergens*, *B. microti*, *T. equi*: Lack és mtsai, 2012). Végül, de nem utolsó sorban azt is érdemes figyelembe venni, hogy a denevérek evolúciójuk során "nagy árat fizettek" az aktív repülő életmódhoz való adaptációjukért, így különösen az (akár más

gazdákból származó) intracelluláris kórokozókra fogékonyak és azok rezervoárjai lehetnek (Brook és Dobson, 2015).

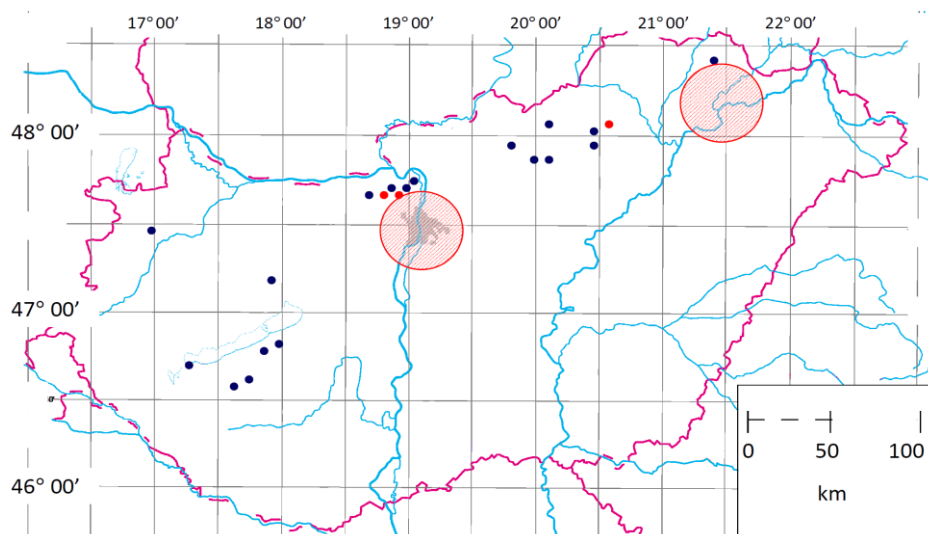
Következtetésképpen, a denevércullancsokról nem ismert, hogy az itt *I. vespertilionis* és *I. simplex* kullancsfajokból molekulárisan kimutatott piroplasmák tipikus gazdáit és rezervoárjait, vagyis kutyákat és kerdőzöket fertőznének. Ennélfogva a denevérek kullancsaiban kimutatott piroplasma DNS szekvenciák legvalószínűbben denevér gazdáik véréből származnak. Ez pedig vagy azt jelentheti, hogy a denevérek a piroplasmáknak a korábban feltételezettnél szélesebb körére fogékonyak, vagy legalábbis ezek DNS-e átjuthat a denevérek bélfal barrierjén a vonatkozó rovar, esetleg pókszabású vektorok emésztése során. Ezen eredmények fényében a denevérek piroplasmosisok járványtanában betöltött szerepe további vizsgálatot igényel.

4.5.3. Denevérek mint humán- és állategészségügyi szempontból jelentős piroplasmák feltételezett rezervoárjai: ürülékvizsgálat

Előzmények

A denevéreket az utóbbi években egyre gyakrabban ismerik fel a kórokozók különféle csoportjainak rezervoárjaiként (Klimpel és Mehlhorn, 2014). Mindazonáltal, míg számos tanulmány foglalkozott denevérekhez társult, növekvő jelentőségű vírusokkal (Calisher és mtsai, 2006) és baktériumokkal (Lin és mtsai, 2012), az utóbbi években csak néhány molekuláris vizsgálatot közöltek vektorok közvetítette egyszjtűek hordozóiként betöltött szerepükről (Concannon és mtsai, 2005; Witsenburg és mtsai, 2014); annak ellenére, hogy a denevérek ízeltlábúakkal – akár táplálékukként, akár ektoparazitáikként – való szoros kapcsolata ismert (Frank és mtsai, 2015). Ezért fogtunk a denevérmintákban előforduló, ízeltlábúak közvetítette egyszjtűek (Apicomplexa: Piroplasmida és más csoportok) alábbi felmérésébe.

Ehhez a molekuláris vizsgálatához denevérürüléket választottunk mintaként, részben nem invazív gyűjthetősége miatt (ami elsődleges szempont kis testű, szigorúan védett állatfajok rövid ideig tartó befogása során). Emellett a denevérürülék elemzése hasznosnak bizonyult a táplálékukban található rovarok molekuláris rendszertani azonosításában (Hope és mtsai, 2014). Másfelől, legjobb tudomásunk szerint ezt a módszert még nem alkalmazták arra, hogy igazolják olyan vektor közvetítette egyszjtűek jelenlétét, amelyekkel a denevérek kapcsolatba kerülhetnek. A mikroorganizmusok DNS-ének denevérürülékből való kimutatása nemcsak a táplálékul szolgált rovarokban vagy a denevérek belében található kórokozókról szolgáltat információt, hanem arról is, hogy a denevérek milyen szerepet játszhatnak az Apicomplexa törzsbe tartozó extraintestinalis kórokozók potenciális rezervoárjaiként. Ezen egyszjtűek invazív stádiumai vagy intracelluláris alakjai ugyanis átjuthatnak a bélfal barrierjén, és így haematropikus protozoonok DNS-e kimutatható mennyiségben távozhat a bélsárral, ahogy ezt a főemlősök plasmodiumai példazzák (Liu és mtsai, 2010).



4.5.3.1. ábra (előző oldal). Mintagyűjtési helyek Magyarország térképén. Csak az egymástól legalább 10 km-re lévő pontok vannak feltüntetve. A piros pöttyök azon helyeket jelölik, ahol *Babesia canis* PCR pozitív denevérürülék mintákat gyűjtöttünk. A sávozott körök két *B. canis* endémiás régiót jelölnek korábbi adataink szerint (Hornok és mtsai, 2006).

Molekuláris módszerek: B, K

Eredmények és megbeszélés

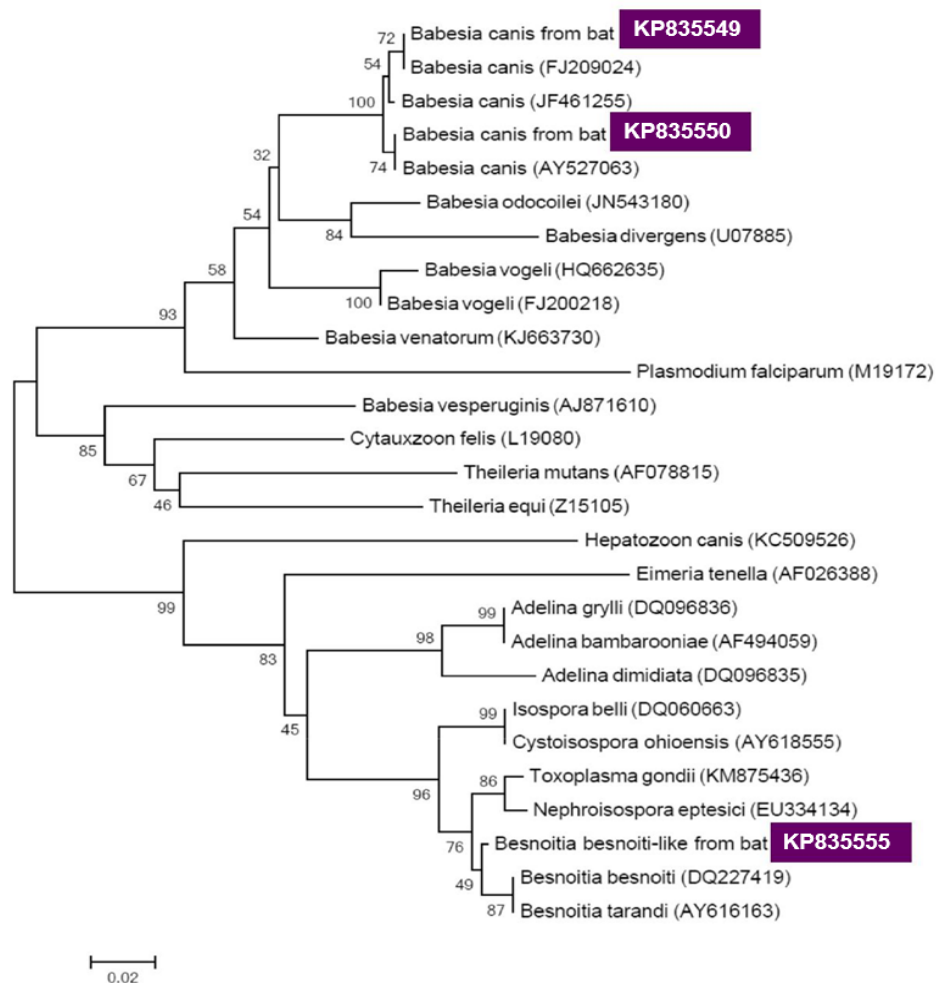
A *Babesia canis* DNS-e öt egyedi mintában volt jelen (prevalencia: 2,7 %, KI: 0,9-6,2 %) (4.5.3.1. táblázat). Két szekvenciát azonosítottunk (GénBank: KP835549-50), két bázispár eltéréssel (GA inverzió: AG a 18S rRNS gén 151-152-es pozíciójában). Ezek a denevér eredetű *B. canis* szekvenciák 100% azonosságot mutattak két horvátországi, kutyából származó szekvenciával (FJ209024 és FJ209025: Beck és mtsai, 2009), és filogenetikailag együtt csoportosultak más *B. canis* izolátumokkal (4.5.3.2. ábra). Másfelől, ezek a szekvenciák csak 88%-os azonosságot mutattak a *B. vesperuginis* fajjal (AJ871610), amelyről ismert, hogy denevéreket fertőz (4.5.3.2. ábra). Mind az öt *B. canis*-pozitív ürülékintát szolgáltató denevért Magyarország azon két régiójának 50 km-es körzetén belül gyűjtöttük (4.5.3.1. ábra), ahol egy korábbi országos felmérésben a legtöbb szeropozitív kutyát találtuk (Hornok és mtsai, 2006). Mindent egybevetve ez volt az első molekuláris bizonyítéka annak, hogy hazánkban előfordul a *B. canis* mindkét fő, eltérő pathogenitású európai genotípusa (A és B: Adaszek és Winiarczyk, 2008).

Dátum	Hosszúság	Szélesség	Denevérfaj (gyűrűszám)	Szekvenálás eredménye (homológia)	Génbanki hozzáférés
VII. 19.	20°33'06"	48°06'02"	<i>Nyctalus noctula</i>	<i>Babesia canis</i> (100 %)	KP835549
VIII. 29.	18°52'30"	47°42'30"	<i>Myotis daubentonii</i> (A5783)	<i>Babesia canis</i> (100 %)	KP835549
VII. 23.	20°36'50"	48°06'39"	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	<i>Babesia canis</i> (99 %)	KP835550
VIII. 29.	18°52'30"	47°42'30"	<i>Myotis daubentonii</i> (A5773)	<i>Babesia canis</i> (99 %)	KP835550
VIII. 30.	18°50'35"	47°41'58"	<i>Myotis alcathoe</i>	<i>Babesia canis</i> (99 %)	KP835550

4.5.3.1. táblázat. A *Babesia canis* DNS-t tartalmazó minták adatai.

Három lehetséges magyarázata van ennek a szokatlan eredménynek. Az első, hogy a szóban forgó denevérek megehették a *B. canis* ismert kullancs vektorának, a *Dermacentor reticulatus* fajnak a példányait. Ennek elbírálásához az öt *B. canis*-pozitív ürülék DNS mintát kullancs DNS jelenlétére teszteltük. Mindegyik PCR negatívnak bizonyult. Ha tehát a szóban forgó denevérek (amelyek ürüléke *B. canis*-pozitív volt) fertőzött kullancs vektort fogyasztottak volna, a *D. reticulatus* kullancsfaj DNS-ének jelen kellett volna lennie ürülékükben, hasonlóképpen a táplálékban előforduló más ízeltlábúakhoz (Witsenburg és mtsai, 2014). Mindezt irodalmi adatok is alátámasztják: bár a denevérek pókszabásúakkal is táplálkoznak, legjobb tudomásunk szerint kullancsokat sohasem írtak le táplálékuk összetevői között (például Pereira és mtsai, 2002; Hope és mtsai, 2014).

A második lehetséges magyarázat háttere, hogy vérszívó legyekről (például *Stomoxys*-fajok) ismert, hogy mechanikai vektorként részt vehetnek a *Babesia*-fajok átvitelében (Friedhoff, 1988). A *Stomoxys calcitrans* (szuronyos istállólegy, másként kutyalégy) gyakran szív vért kutyákon (Fankhauser és mtsai, 2015), ugyanakkor egyes denevérfajok táplálékának fontos összetevője (Kervyn és mtsai, 2012). Ennek tükrében a denevérürülékben kimutatott *B. canis* DNS származhatott olyan vérszívó legyektől, amelyek parasitaemiás kutyából szívtak vért (amire a két *B. canis* endémiás régióban megvolt a lehetőség) és utána a szóban forgó denevérek megették. Sajnos két tényező megghiúsította e hipotézis azonnali vizsgálatát: (a) ezeknek a denevéreknek a teljes ürülékmenyiségét DNS kivonáshoz használtuk fel, így nem volt lehetőség legyek maradványait keresni és morfológiai alapon azonosítani benne; (b) és PCR alapú, *Stomoxys*-specifikus molekuláris módszer nem állt a rendelkezésünkre.



4.5.3.2. ábra. A vizsgálatban kimutatott egyszéjtűek (inverz, lila szín) filogenetikai viszonyai.

A harmadik magyarázat szerint a *B. canis* DNS jelenléte egyes ürülékmintákban azt is jelentheti, hogy a mintát szolgáltató denevérek fertőzöttek (parasitaemiások) voltak, amely esetben a babesia DNS a keringésből juthatott a béltartalomba (más, az erythrocytákat fertőző protozoonokhoz hasonlóan, amilyenek például a plasmodiumok: Liu és mtsai, 2010). E lehetőséget az is alátámasztja, hogy a *D. reticulatus* lárvák, nymphák kedvelt rágcsáló gazdái között számos *Apodemus*-faj arborealis, azaz előszeretettel másznak fákra (Holišová, 1969). A *Dermacentor* lárvákról és nymphákról ismert, hogy előfordulnak ilyen fakoronák közeli fészkekben (fa odúban) (Durdin és mtsai, 2000), és így akár rágcsálókra, akár odúlakó denevérré is rákerülhetnek (Apanaskevich és Bermúdez, 2013). Mind a négy denevérfajról, amelyek ürüléke *B. canis* pozitív volt (4.5.3.1. táblázat), ismert, hogy a nyári időszakban pihenőhelyként előszeretettel választanak fa odúkat (Dietz és mtsai, 2009; EUROBATS, 2010), ahol tehát elvileg fertőződhetnek *Dermacentor* preadult stádiumokkal (ahogy ezt például egy júliusban mintázott *Pipistrellus pipistrellus* egyedről jelentették: Filippova és mtsai, 1976). Ennélfogva nem lehet teljesen kizárni, hogy azok a denevérek, amelyek ürüléke *B. canis* PCR pozitív volt, valóban fertőzöttek voltak e piroplassmával. Mindennek taxonómiai magyarázata is van (figyelembe véve, hogy a paraziták gazdái gyakran rendszertanilag rokon csoportokból kerülnek ki): a *B. canis* fajra való – legalább részleges – fogékonytágot eddig két emlős rendből írták le, amelyek a ragadozók (Carnivora) és a páratlanujjú patások (*Perissodactyla*) (Hornok és mtsai, 2007b), amelyek egy nagy kládot (*Pegasoferae*) alkotnak a denevérekkel (*Chiroptera*) (Nishihara és mtsai, 2006).

Következésképpen, vizsgálatunk eredménye azt sugallja, hogy a kutya babesiosis járványtánának vannak olyan aspektusai, amelyek ismeretlenek illetve jelentőségüket alábecsülik. Ide tartozik a rovarok általi mechanikai átvitel potenciális szerepe és a denevérek fogékonytága a *B. canis* fajra.

4.5.4. Borz eredetű *Babesia*-faj DNS-e kutyákban

Előzmények

A piroplasmák közé tartozó *Babesia*- és *Theileria*-fajok kullancs közvetítette egysejtű kórokozók. Vadon élő ragadozóknál egyre több új *Babesia* genotípust/fajt fedeznek fel (például Japánban: Jinnai és mtsai, 2009), és ugyancsak megnőtt azon családok száma a ragadozók rendjén (Carnivora) belül, amelyek képviselőiben piroplasmák előfordulásának molekuláris bizonyítékát írják le (például Ursidae: Jinnai és mtsai, 2010; Herpestidae: Leclaire és mtsai, 2015; Hyaenidae: Williams és mtsai, 2014). Továbbá, rendszerint egyedi esetben, előfordulhatnak ragadozóknál tőlük rendszertanilag távolabbi gazda taxonokból ismert piroplasmák is. Ezeket példázza kutyákban a *Theileria equi* és a *Babesia caballi* (tipikus gazdái: Equidae) (Criado-Fornelio és mtsai, 2003a; Beck és mtsai, 2009); vagy szürkefarkasban a *T. capreoli* (tipikus gazdái: Cervidae) (Beck és mtsai, 2017). Az ilyen alkalmi fertőzések akár klinikai tünetekkel is járhatnak ragadozóknál mint "atipikus gazdákban" (Beck és mtsai, 2009). Ezek az adatok alátámasztják, hogy a ragadozók egy fontos csoportot alkotnak a piroplasmák gazdaspecificitásának vizsgálata szempontjából, különösen a házi és vadon élő ragadozók közös kórokozó (járványtani értelemben vett "érintkezési felületének") témakörében, minthogy ezek között mindkét kategória képviselőit fertőző *Babesia*-fajok is ismertek (Alvarado-Rybak és mtsai, 2016). A fenti összefüggésben ez a vizsgálatunk arra irányult, hogy molekuláris módszerekkel keressünk és vizsgáljunk piroplasmákat hazánk egy olyan térségében, ahol az utóbbi években újabb kullancsfaj és kullancs közvetítette kórokozók bukkantak fel (4.6.7., 4.7.3., 4.7.8. fejezet). Ennek érdekében vérmintákat és kullancsokat gyűjtöttünk kutyákból és borzokból, és ezeket DNS kivonást követően PCR módszerrel és szekvenálással vizsgáltuk.

Molekuláris módszerek: K

Eredmények

A vér DNS minták szerint 90 kutyából 11, és mind az öt borz PCR pozitív volt piroplasmákra. A szekvenálás két *Babesia*-fajt azonosított kutyákban (4.5.4.1. táblázat).

4.5.4.1. táblázat. A molekuláris vizsgálatok eredményei.

	Kutyák száma tartásmód szerint			Borzok száma (n = 5)	Kullancsok száma	
	vadász (erdőben) (n = 6)	gyakran viszik erdőbe (n = 6)	más (n = 78)		<i>Ixodes canisuga</i> (n = 27)	<i>Ixodes hexagonus</i> (n = 6)
<i>Babesia</i> sp. borz A-típus	4 (66,7%)	1 (16,7%)	1 (1,3%)	5 (100%)	18 (66,7%)	0
<i>Babesia canis</i>	0	0	5 (6,4%)	0	0	0
<i>Babesia</i>-negatív	2 (33,3%)	5 (83,3%)	72 (92,3%)	0	9 (33,3%)	6 (100%)

Hat kutya vérében annak a *Babesia*-fajnak a DNS-e volt jelen, amelyet korábban európai borzból (*Meles meles*) azonosítottunk Magyarországon, és a *Babesia* sp. Meles-Hu1 nevet kapta (GénBank: KX218234). Ez a genotípus megfelel a *Babesia* sp. borz A-típusnak, amelyet előzőleg Spanyolországból (GénBank: KT223484) és utánunk Angliából (KX528553) jelentettek, és a hazai genotípussal való egyezésük 100% (472/472 bp) illetve 99,8% (471/472 bp) volt. Ezen felül a *B. canis* DNS-ét is kimutattuk öt kutya vérmintájában: egy esetben ez az "A" genotípusba tartozott (430/430 bp; 100% azonossággal ehhez a hazai génbanki szekvenciához: KP835549), míg négy mintában a "B" genotípusba (430/430 bp; 100% azonossággal ehhez a hazai génbanki szekvenciához: KP835550). Mind az öt borz vérmintában a *Babesia* sp. Meles-Hu1 DNS-e volt jelen, amelyek 100%-ban (472/472 bp) megegyeztek a fenti, kutyából származó izolátummal.

A *Babesia*-fajok előfordulásának a kutyák tartásmódja szerinti megoszlása a következő volt. A *Babesia* sp. Meles-Hu1 DNS-e szignifikánsan ($P = 0,0001$) gyakrabban fordult elő olyan kutyákban, amelyeket gyakran visznek erdőbe (12-ből öt esetben), szemben azokkal, amelyeket nem (78-ből egy esetben) (4.5.4.1. táblázat). Továbbá, e *Babesia*-faj DNS-ének jelenléte szignifikánsan ($P = 0,00008$) összefüggött a kutyák erdei vadászatra használatával (hatból négy volt fertőzött) azokkal összehasonlítva, amelyekkel nem vadásztak (84-ből kettő) (4.5.4.1. táblázat). A mintavételi időpontot figyelembe véve a két *Babesia*-faj DNS-ének előfordulása a kutyák vérében eltérő szezonálisitást mutatott: a *Babesia* sp. Meles-Hu1 olyan vérmintákban volt jelen, amelyeket márciusban ($n=3$) és augusztusban ($n=3$) gyűjtöttünk, míg a *B. canis* azonosítására májusi ($n=2$) és szeptemberi ($n=3$) mintákból került sor. Fontos az is, hogy két kutya (amelyek egyikéből a borz eredetű *Babesia* sp. Meles-Hu1, a másiktól pedig a *B. canis* szekvenciáját kaptuk) a babesiosisra jellemző tüneteket mutatott (fáradékonyság, veseelégtelenség, illetve anaemia, icterus).

Összesen 19 kullancsot gyűjtöttünk kutyákról, míg 53 kullancsot borzokról. Ezek faji megoszlása a következő volt: kutyákról *Dermacentor reticulatus* ($n = 10$), *Ixodes ricinus* ($n = 8$) és *I. hexagonus* ($n = 1$); borzokról: *I. canisuga* ($n = 34$), *D. reticulatus* ($n = 7$), *I. hexagonus* ($n = 6$), *I. ricinus* ($n = 3$), *I. kaiseri* ($n = 2$) és *Haemaphysalis concinna* ($n = 1$). A molekulárisan vizsgált 33, a *Pholeoixodes* subgenusba tartozó kullancsból csak a *Babesia* sp. Meles-Hu1 DNS-ét tudtuk kimutatni. Érdekes, hogy bár mind az *I. canisuga* ($n=27$), mind az *I. hexagonus* ($n=6$) vérszívott példányait a parasitaemia szakában lévő borzokról gyűjtöttük (mint a fenti eredményekből ez kiderült), az *I. hexagonus* példányok egyike sem volt PCR pozitív, de az *I. canisuga* DNS mintáinak 66,7%-a (27-ből 18) a *Babesia* sp. Meles-Hu1 genotípust tartalmazta (4.5.4.1. táblázat). Ez utóbbi piroplasma előfordulása tehát szignifikánsan ($P = 0,0045$) összefüggött az *I. canisuga* kullancsfajjal.

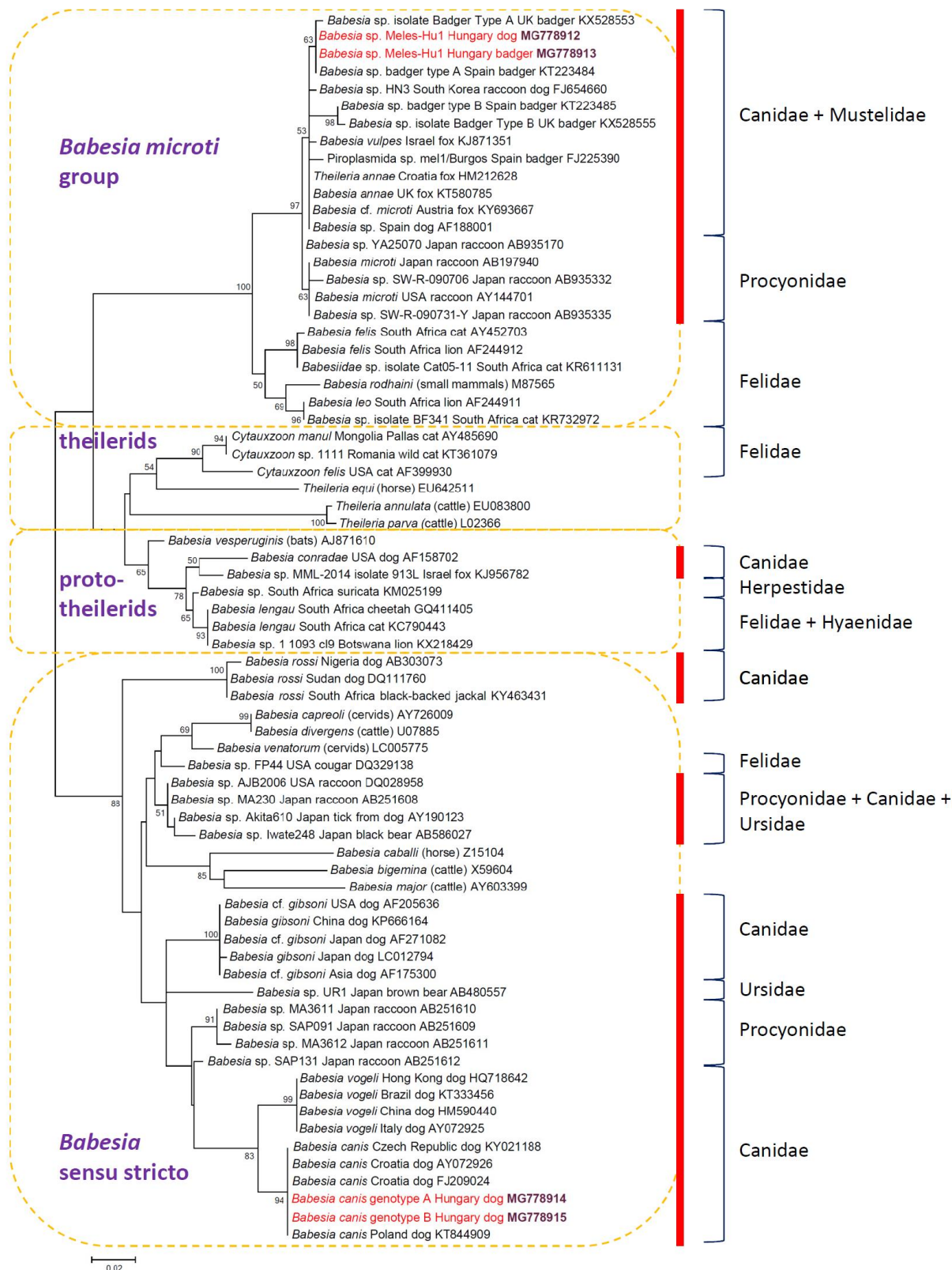
Filogenetikailag, a vizsgálatunkban azonosított *B. canis* genotípusok az ehhez a fajhoz tartozó más szekvenciákhoz illeszkedtek a *Babesia* (*sensu stricto*) kládon belül (4.5.4.1. ábra). Másfelől, a *Babesia* sp. Meles-Hu1 kutyákból és borzokból nyert szekvenciái a "*B. microti* filogenetikai csoportot" képviselték (4.5.4.1. ábra).

Megbeszélés

Munkánk során, amelynek célja kutyák és borzok vér és kullancs mintáinak molekuláris vizsgálata volt piroplasmák jelenlétére, a *B. canis* és a *Babesia* sp. Meles-Hu1 DNS-ét is azonosítottuk. Korábban európai borzban a "*Babesia* sp. borz" A- és B-típusát, valamint a *B. annae* fajt is kimutatták (Barandika és mtsai, 2016). Kutyákban mint tipikus gazdáikban pedig – világviszonylatban – a következő három ún. kis babesia előfordulása volt eddig ismert: *B. gibsoni*, *B. annae* (syn. *T. annae* és *B. cf. microti*) és *B. conradae*; továbbá a kutyák három ún. nagy babesiára is fogékonyak, amelyek a *B. canis*, a *B. vogeli* és a *B. rossi* (Kjemtrup és mtsai, 2000). Ritkán olyan piroplasmák DNS-ét is igazolták kutyákban, amelyek tipikus gazdái a ragadozók Carnivora rendjén kívül esnek (például *B. caballi*: Beck és mtsai, 2009). Azonban ez az első eset, hogy borzhoz társult *Babesia*-faj DNS-ét sikerül azonosítani kutyákban mint gazdáikban. Figyelembe véve, hogy a *Babesia* sp. Meles-Hu1 egy vizsgálat során hat kutyában is előfordult (amelyek közül egy még a babesiosis tüneteit is mutatta), eredményeink arra engednek következtetni, hogy e borz eredetű babesia jelenléte kutyákban nem kivételes, sőt még kórtani hatása is lehet.

A kutyákban e vizsgálat során Délnyugat-Magyarországon azonosított borz eredetű babesia megfelelt a *Babesia* sp. Meles-Hu1 genotípusnak, amelyet korábban Kelet-Magyarországon mutattunk ki (GénBank: KX218234). Ez a faj széleskörű hazai előfordulására utal. Országunkban az A- és B-genotípusba tartozó *B. canis* (GénBank: KP835549 és KP835550) jelenlétére is vannak adataink, denevérek-ből (4.5.3. fejezet) és növényzetről gyűjtött *D. reticulatus* kullancsokból egyaránt (4.4.4. fejezet).

Az, hogy a *Babesia* sp. Meles-Hu1 pozitív minták túlnyomó többsége erdőbe látogató kutyákban fordult elő (beleértve a vadász-kutyákat) rávilágít a borzok kedvelt hazai élőhelyének (tehát az erdők: Márton és mtsai, 2016) jelentőségére e fertőzőség járványtanában. Konkrétabban, az ilyen erdős területekre vitt kutyák – főleg ha vadászat közben borzokkal is kapcsolatba kerülnek – nagyobb eséllyel fertőződhetnek *I. canisuga* kullancsfajjal borzoktól vagy borzok búvóhelyéről (üregéből).



4.5.4.1. ábra. A piroplasmák filogenetikai rokonsága a ragadozók (Carnivora rend) családjai szerint. A függőleges piros vonal a Caniformia alrendet jelöli. A jelen vizsgálat szekvenciáit piros fajnév és vastag, bordó génbanki szám emeli ki.

Másfelől, valamennyi *B. canis*-pozitív kutya az erdőkhöz nem kapcsolódó mintacsoportból került ki, ami valószínűleg azzal függ össze, hogy a piroplasma vektora, a *D. reticulatus* egy nyílt (füves) térséget kedvelő kullancsfaj (Uspensky, 2002; Magyarországon: 4.3.1. fejezet). Ezen a téren való előfordulási különbségen túl a *B. canis* illetve *Babesia* sp. Meles-Hu1 DNS-t tartalmazó minták időbeli eltolódása minden bizonnyal vektoraik aktivitási periódusának évszakos különbségeiből adódott.

Már korábban felvetették, hogy az *I. canisuga* lehet egyes, a borzokhoz társult piroplasmák, így a *B. missirolii* biológiai vektora (Biocca és Corradetti, 1952). Ezt a "potenciális vektor" szerepet molekuláris kullancsvizsgálatunk eredményei (*I. canisuga* vs. *I. hexagonus*) is megerősítették. Korábban leírták, hogy az *I. canisuga* hazánkban előfordul kutyákon (Földvári és Farkas, 2005), és az ilyen alkalmak lehetőséget nyújtanak egy kullancs közvetítette kórokozó átjutására borzok és kutyák között (amennyiben a kutyára jutó kullancs előző stádiumában vagy generációjában borzon szívott vért). Másfelől – figyelembe véve, hogy kutyákat a borzok megfogására is használhatnak a vadászat során – a szóban forgó kutyák *Babesia* sp. Meles-Hu1 genotípussal szájon át való fertőződése sem zárható ki teljesen. Emellett szól ugyanis, hogy (a) a harapás útján való (tehát vérrel seben keresztül) fertőződés ismert egyes babesiák (pl. *B. gibsoni*) esetében (Jefferies és mtsai, 2007), és (b) a szájon át történő fertőződés lehetséges annak a filogenetikai csoportnak a típus fajánál (*B. microti*), ahová a *Babesia* sp. Meles-Hu1 tartozik (Malagon és Tapia, 1994).

A filogenetikai vizsgálat rámutatott, hogy a *B. microti* csoportban a Caniformia alrend családjainak (Mustelidae, Canidae és Procyonidae) piroplasmái összetartoznak, viszont jól elkülönülnek (100%-os támogatottság mellett) attól a kládtól, amelyet a Feliformia alrend piroplasmái alkotnak (4.5.4.1. ábra). Számos példa bizonyítja, hogy egy családon belül a ragadozók különféle fajai ugyanarra a piroplasmára (például Kutya-félék: *B. canis*) fogékonyak, de egyes *Babesia* fajok fertőzhetnek ragadozókat a Caniformia alrend különböző családjaiból is (amit jól példáz a *B. microti*-szerű fertőzőttség magas prevalenciája a kutya-félék (Canidae) családjában éppúgy, mint a mosómedve-félék (Procyonidae) között: Alvarado-Rybak és mtsai, 2016).

Következésképpen, ez az első alkalom, hogy az európai borzhoz mint gazdához társult *Babesia*-faj DNS-e kimutatható volt kutyákban, amelyek közül az egyik babesiosissal összefüggő klinikai tüneteket is mutatott. Vizsgálatunkban a "borz babesiát" hordozó kutyák száma felülmúlta a *B. canis* által fertőzöttékét, ami arra utal, hogy nem csupán kivételes (egyedi, izolált) esetekről lehet szó. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az erdőbe vitt (vadászó vagy ott sétáltatott) kutyák gyakrabban kerülhetnek kapcsolatba ezzel a piroplasmával, valószínűleg az *I. canisuga* kullancsfajjal való fertőzés következtében (leginkább borzok kotorékából). Ennek értelmében a *Babesia* sp. Meles-Hu1 azon piroplasmák köréhez tartozik, amelyek természetes úton megtelepedhetnek a Caniformia alrend különböző családjaiban.

4.5.5. Vadon élő ragadozók és a szarvasmarha Anaplasmataceae családba tartozó baktériumainak DNS-e kutyákban

Előzmények

Európában a kutyák az Anaplasmataceae család legalább négy neméből fogékonyak kórokozókra. Közülük az *Anaplasma platys* a vérlemezkéket, az *A. phagocytophilum* a neutrophil granulocytákat, az *Ehrlichia canis* pedig a monocytákat fertőzi és károsítja. Ebből fakadóan ezeket a kutyák fontos kórokozóinak tartják (Dumler és mtsai, 2001; Dumler, 2012). Ugyanakkor a *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (Diniz és mtsai, 2011; Hofmann-Lehmann és mtsai, 2016) és a *Neorickettsia risticii* fertőzőtséget (Amusatégui és mtsai, 2008) is leírták kutyában. Ezen túlmenően a dirofilariosis során *Wolbachia* DNS lehet jelen a kutyák vérében (Rossi és mtsai, 2010). Az is előfordulhat azonban, hogy egy adott felmérésben szereplő kutyák teljesen PCR-negatívak az Anaplasmataceae család képviselőire (például Dahmani és mtsai, 2017).

Nemrég vidéki kutyákból molekuláris bizonyítékot szolgáltatottunk egy borz eredetű babesia genotípus jelenlétére, ami rávilágított arra, hogy a vidéki környezetben (tehát a természet illetve haszonállatok közelében) tartott kutyák – különösen ha vadászatra is használják vagy gyakran viszik

erdőbe őket – kapcsolatba kerülhetnek a vadon élő ragadozók kullancs közvetítette kórokozóival (4.5.4. fejezet). Ezért újabb vizsgálatunk célja az volt, hogy e vidéki kutyák vérmintáit molekuláris eszközökkel teszteljük az Anaplasmataceae család képviselőinek jelenlétére.

Molekuláris módszerek: M, N, O, P, Q, R

Eredmények

A kutyákból származó 90 vér DNS minta közül 18 lett PCR pozitív az Anaplasmataceae család valamely képviselőjére, míg a borzoknál ugyanez az arány öt mintából kettő (4.5.5.1. táblázat). Ezen felül hat kullancs DNS minta is PCR pozitívnak bizonyult (öt *Ixodes canisuga*, egy pedig *Haemaphysalis concinna* fajból, míg valamennyi *I. hexagonus* negatív volt). A pozitív mintákban az Anaplasmataceae család hat tagját azonosítottuk további PCR-ek és szekvenálás segítségével, ahogy ezt alább részletezem. Kullancsokat nem találtunk azon kutyákon, amelyek a PCR pozitív vérmintákat adták.

4.5.5.1. táblázat. A molekuláris vizsgálatok eredményei.

Genotípus/faj	Kutya: +/Σ	Borz: +/Σ	Kullancs: +/Σ	Max. szekv. hasonlóság - Gén: bp/bp (%)	Referencia ghsz	Új szekv. ghsz
<i>A. marginale</i>	2/90	-	-	16S: 1212/1212 (100%)	KT264188	MH020201
				<i>msp4</i> : 798/798 (100%)	HM063432	MH020208
<i>A. phag.</i>	1/90	-	-	16S: 306/306 (100%)	EU982548	MH020202
<i>Ehrlichia</i> sp.	1/90	-	4/27 (Ic)	16S: 1308/1310 (99,8%)	KR262717	MH020203
<i>Ca. Neoehrlichia lotoris-szerű</i>	6/90	2/5	1/27 (Ic)	16S: 868/868 (100%)	KX231830	MH020204
				<i>groEL</i> : 758/761 (99,6%)	KX245423	MH020209
<i>Wolbachia (Arthropoda)</i>	3/90	-	-	16S: 1211/1216 (99,6%)	DQ115537	MH020205
	-	-	1/1 (Hc)	16S: 627/627 (100%)	MF461482	MH020207
<i>Wolbachia (Nematoda)</i>	5/90	-	-	16S: 1216/1216 (100%)	KY114937	MH020206

Rövidítések: A. - *Anaplasma*; phag. - *phagocytophilum*; Ca. - *Candidatus*; +/Σ - pozitív/mind; Ic - *Ixodes canisuga*; Hc - *Haemaphysalis concinna*; ghsz - génbanki hozzáférési szám; szekv. - szekvencia

Anaplasma marginale

A kérődzők valamely *Anaplasma*-fajának rövid 16S rRNS szekvenciáját két kutyából mutattuk ki. A hosszabb 16S rRNS szekvencia e mintákból azonos volt több, az Ó- és Újvilágból közölt *A. marginale* szekvenciával (4.5.5.1. táblázat), a 4-es fő felületi fehérje (*msp4*) gén viszont csak azzal az egy genotípussal egyezett, amelyet korábban hazai szarvasmarhából és kullancsokból (*Dermacentor reticulatus* és *Ixodes ricinus*) is kimutattunk (4.5.5.1. táblázat). Ez az *A. marginale* genotípus filogenetikailag egyik fő csoportba sem került, amelyet génbanki, azonos fajú szekvenciák alkottak (4.5.5.1. ábra). A törzsfán pozíciója rövid evolúciós (horizontális) távolságot mutatott.

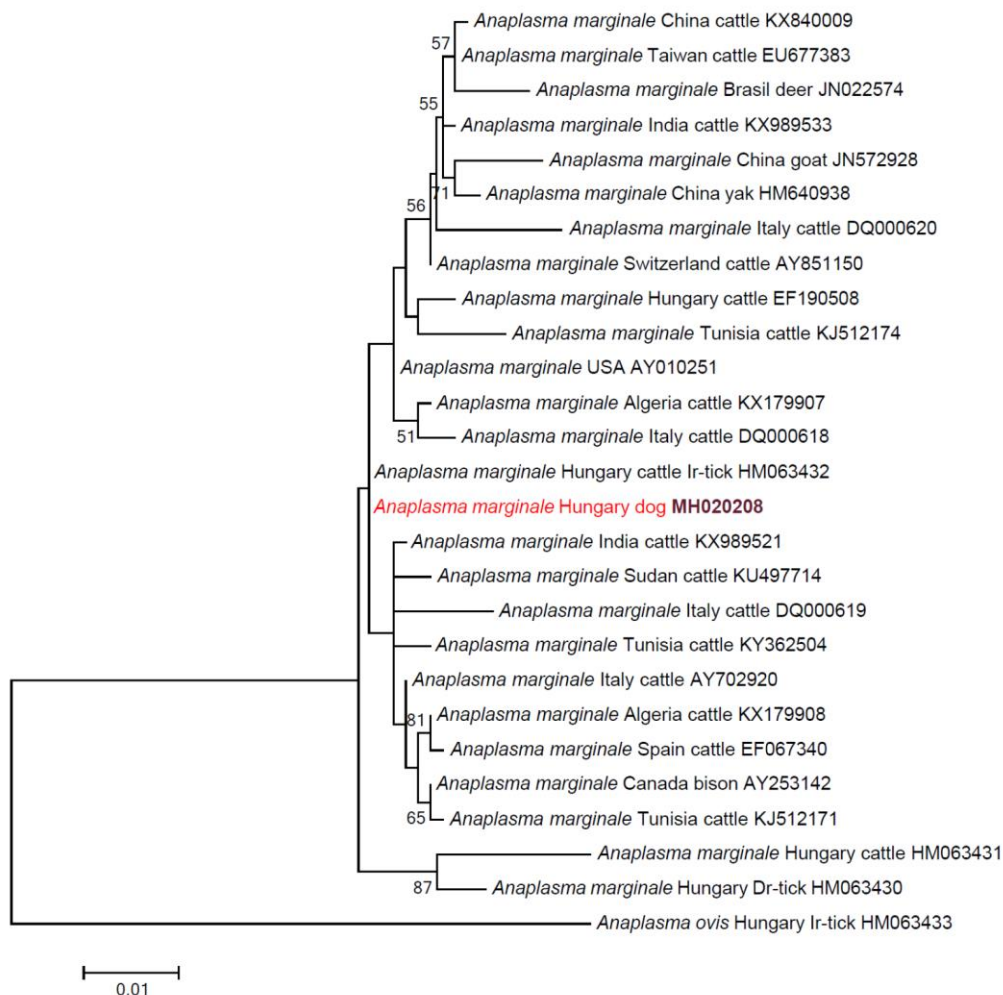
Anaplasma phagocytophilum

Egy kutya vérmintája tartalmazott *A. phagocytophilum* DNS-t. A 16S rRNS gén alapján ez 100%-ban azonos volt számos génbanki szekvenciával, például Olaszországból (4.5.5.1. táblázat). A 2-es fő felületi fehérje (*msp2*) gént szintén sikerrel mutattuk ki e mintából (Ct érték: 33,7).

Borz eredetű *Ehrlichia*-faj

A 16S rRNS gén rövidebb szakasza alapján öt DNS mintából kaptunk olyan szekvenciát, amely legközelebb (306/307 bp = 99,7%) egy spanyolországi borzból kimutatott *Ehrlichia*-fajhoz állt (GénBank: KR262717). Az öt DNS minta forrása között volt egy kutya (a rendszeresen erdőbe vitt csoportból, n=6) és négy *I. canisuga* kullancs (mind a 3. számú borzról). E hazai genotípus hosszabb 16S rRNS gén

szakasza 99,8%-ban volt azonos a spanyol mintáéval (4.5.5.1. táblázat), és csupán 98,1%-ban a *Candidatus E. khabarensis* fajéval (GénBank: KR063138). A filogenetikai elemzés megerősítette, hogy ez a hazánkban a világon először kimutatott, kutya eredetű *Ehrlichia* izolátum különbözik mind a *Ca. E. khabarensis* fajtól, mind a spanyol borz eredetű *Ehrlichia*-fajtól, bár ez utóbbi támogatottsága csak mérsékelt (91%) volt (4.5.5.2.a ábra).



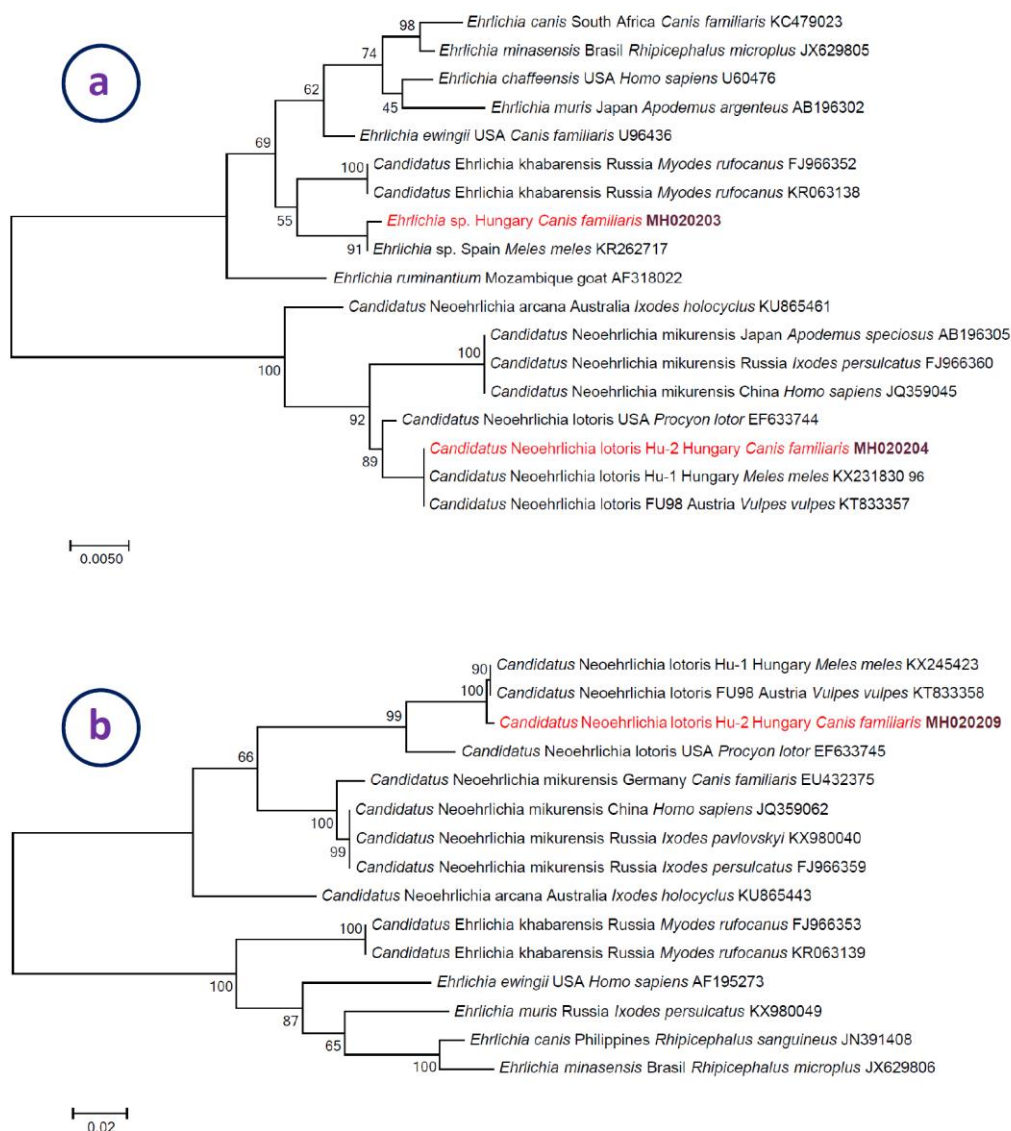
4.5.5.1. ábra. A kutya eredetű *Anaplasma marginale* szekvencia (piros szín) filogenetikai viszonyai (ML törzsfa).

***Candidatus Neoehrlichia lotoris*-szerű genotípus**

Egy *Neoehrlichia* nembe tartozó faj rövid 16S rRNS génszakaszát (ami itt *Ca. Neoehrlichia lotoris* Hu-2 néven szerepel) hat kutyaéból, két borzból (3. és 5. számú) és egy *I. canisuga* kullancsból (a 3. számú borzról) mutattuk ki. A 16S rRNS gén hosszabb szakaszában ez 100%-ban egyezett a *Ca. Neoehrlichia lotoris* Hu-1 (GénBank: KX231830) és FU98 (GénBank: KT833357) genotípusokkal, amelyeket nemrég közöltünk európai borzból (Kelet-Magyarország) illetve közöltek vörös rókából (Ausztria). Vizsgálatainkban a 16S rRNS gén felerősített szakaszának teljes hossza meghaladta az eddig Európában leírtakét, és 99,3% (1214/1222 bp) azonosságot mutatott a *Ca. N. lotoris* fajjal mosómedvéből (USA) (GénBank: EF633744: 4.5.5.2.a ábra).

A három európai *Ca. N. lotoris*-szerű izolátum együttes filogenetikai csoportosulása megerősítette 16S rRNS gén azonosságukat (4.5.5.2.a ábra). Azonban a *Ca. N. lotoris* Hu-2 chaperon (hő sokk) fehérje gén (*groEL*) szekvenciája különbözött az eddig ismertektől, mivel csak 99,6%-ban volt azonos a *Ca. N. lotoris* Hu-1 (KX245423) és az FU98 (KT833358) genotípusokéval. A *groEL* törzsfa a kutya izolátum és a vadon élő ragadozók izolátumainak elkülönülése erős (100%) támogatottságot

kapott (4.5.5.2.b ábra). Fontos megjegyezni, hogy a *Ca. N. lotoris* Hu-2 DNS-e szignifikánsan ($P = 0,00008$) gyakrabban fordult elő vadászkutyákban (hatból négy esetében) a vadászatra nem használt kutyákhoz képest (84-ből kettő).



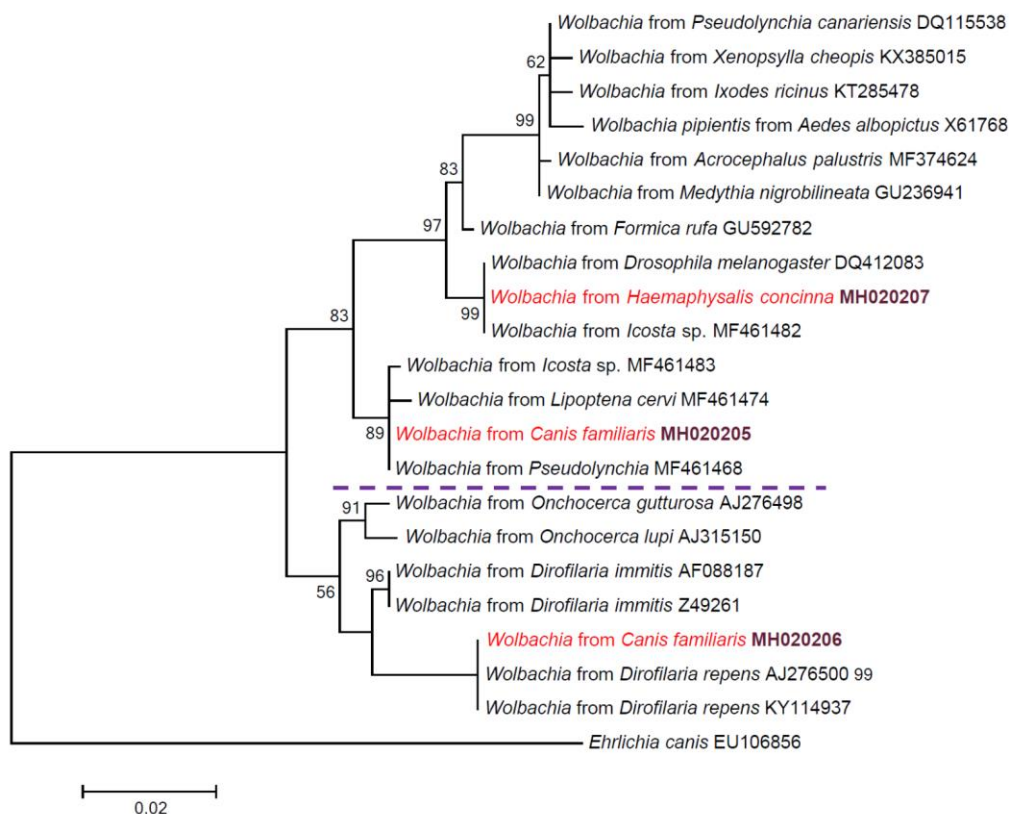
4.5.5.2. ábra. A kutya eredetű *Ehrlichia* és *Neoehrlichia* szekvenciák (piros szín) filogenetikai viszonyai (ML törzsfa: a. 16S rRNS gén, b: groEL gén).

Wolbachia genotípusok

Rövid 16S rRNS *Wolbachia* szekvenciát nyolc kutya vérében és egy, borzról gyűjtött *H. concinna* kullancsban mutattunk ki (4.5.5.1. táblázat). Közülük négy izeltlábú eredetű wolbachiak, míg öt fonálféreg wolbachiak génbanki szekvenciáival állt közelebbi rokonságban. Három, kutyából nyert, hosszabb *Wolbachia* 16S rRNS szekvencia a legnagyobb fokú hasonlóságot különféle, a *Pseudolynchia* nembe (Hippoboscidae család) tartozó ektoparazitákból (kullancslegyekből) közölt wolbachia izolátumokkal mutatta, hosszabb (1216 bp) és kissé rövidebb (1062 bp) lefedettség (közös szakasz) mellett egyaránt (az azonosság a DQ115537 és MF461468 génbanki számú szekvenciákkal összevetve 99,6-99,8% volt) (4.5.5.1. táblázat). Ez a kutya eredetű *Wolbachia* genotípus szintén filogenetikai rokonságban áll egyéb kullancslégy-fajokból (Hippoboscidae család: *Lipoptena cervi*, *Icosta* sp.) kimutatott wolbachiakkal (4.5.5.3. ábra). A borz kullancsból felerősített *Wolbachia* genotípus 16S rRNS szekvenciája 100% egyezést mutatott az *Icosta* sp. endosymbiontájával (4.5.5.1. táblázat). A 16S rRNS

törzsfán (4.5.5.3. ábra) a fenti négy *Wolbachia* genotípus (három kutya vérből, egy *H. concinna* kullancsból) az ízeltlábúakhoz társult wolbachiák filogenetikai csoportjába tartozott.

Ezzel szemben, egy további *Wolbachia*-faj hosszabb 16S rRNS szekvenciája (amelyet öt kutyából azonosítottunk) 100% azonosságot mutatott a filaroid fonálféreg, a *Dirofilaria repens* endosymbiontájával (GénBank: KY114937, 4.5.5.1. táblázat). Ezek a 16S rRNS törzsfán is együtt helyezkedtek el, a fonálféreghez társult wolbachiák kládjában (4.5.5.3. ábra).



4.5.5.3. ábra. A kutya eredetű *Wolbachia* szekvenciák (piros szín) filogenetikai viszonyai (ML törzsfa).

Megbeszélés

A fenti eredmények molekuláris bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az Anaplasmataceae család több nemének képviselőiből származó DNS is jelen lehet kutyák vérében. Egy (az *Anaplasma phagocytophilum*) kivételével ezek előfordulását eddig még nem írták le kutyákban. Felmérésünkhöz vidéki kutyákat választottunk, mivel ezek városi társaiktól eltérő környezetben élnek. A vidéki kutyák nagyobb valószínűséggel kerülnek kapcsolatba haszonállatokkal és vadakkal a kullancs közvetítette baktériumok szempontjából, és e járványtani kapcsolat következtében nagyobb eséllyel lehet (helyileg) új kórokozót találni bennük, beleértve az Anaplasmataceae család képviselőit (Proboste és mtsai, 2015). Mindazonáltal – mivel vizsgálatunk során a PCR pozitív kutyákat a mintavétel időpontjában nem találtunk kullancs fertőzöttnek –, a kullancs közvetítette baktériumok illetve DNS-ük előfordulása itt korábbi kullancs fertőzöttségre utal.

Az *Anaplasma*-, *Ehrlichia*- és *Neoehrlichia*-fajokat általánosságban az jellemzi, hogy emlős gazdáik között elsősorban kullancsok révén terjednek (Dumler és mtsai, 2001). Közülük az *A. marginale* fajt, amelynek tipikus gazdája a szarvasmarha, de itt kutyából mutattuk ki, a *D. reticulatus* hímjei vihetik át (Zivkovic és mtsai, 2007). Ez a kullancsfaj Magyarországon gyakori kedvencként tartott kutyákon (Földvári és Farkas, 2005). Más, *D. reticulatus* közvetítette és patásokból (lovakból) származó kórokozók (így a *Babesia caballi*, *Theileria equi*) kutyákban való előfordulását a jelen vizsgálat helyszínét (Délnyugat-Magyarország) határoló Horvátországban már kimutatták (Beck és mtsai, 2009). Másfelől, szokatlan eredményünk (*A. marginale* kutyákban) nem egyedi jelenség a tekintetben, ha a kérődzők *Anaplasma*-fajait összességében nézzük, ugyanis az *A. bovis* (amelynek tipikus gazdája a

szarvasmarha, a monocytákat károsítja és az *A. phagocytophilum* rokona), szintén előfordul kutyákban (Sakamoto és mtsai, 2010).

Génbanki adatok szerint a szóban forgó *A. marginale* genotípust (amelyet hazánkban szarvasmarhában és kutyában találtunk meg) semmilyen más országból nem írták le. Fontos körülmény, hogy a Magyarországon felbukkanó és növekvő jelentőségű klinikai szarvasmarha anaplasmosis összefüggésében ez volt a szarvasmarhákban leggyakrabban kimutatott új genotípus, amelyet *I. ricinus* kullancsfajban is azonosítottunk (Hornok és mtsai, 2012d). Ennek az *A. marginale* genotípusnak a pathogenitása egy endémiás stabilitással jellemezhető régióban (Hornok és mtsai, 2012d) és itt vázolt filogenetikai viszonyai arra utalnak, hogy evolúciós szempontból új ("fiatal") változatról lehet szó.

A genus egy másik tagját, az *A. phagocytophilum* fajt is kimutattuk egy kutyából. Ez a lelet nem újdonság, hiszen a kutyák ismert gazdái e kórokozónak, ahogy előzőleg Magyarországon is jelentettük (Hornok és mtsai, 2013b). Mindazonáltal, két következtetést ebből is levonhatunk. Először is, szakirodalmi adatokból úgy tűnik, a házi és vadon élő ragadozók kiemelt szerepet játszanak az *A. phagocytophilum* zoonotikus ökotípusának rezervoárjaiként (Jahfari és mtsai, 2014), és ezért külön figyelmet érdemelnek a granulocytás anaplasmosis járványtanában. Másrészt, jelen vizsgálatunk eredményei szempontjából fontos körülmény, hogy – olyan baktériumok mellett, amelyek kutyában való előfordulása szokatlan –, olyan kórokozót is kimutattunk (mégpedig hasonló módszerrel), amelynek a kutyák ismert gazdái: ez azt támasztja alá, hogy az itt tesztelt kutyák fogékonyak is lehettek az Anaplasmataceae családból kutyákban újonnan kimutatott baktériumok némelyikére.

Egy kutyában és négy *I. canisuga* kullancsban egy borz eredetű *Ehrlichia*-faj közeli rokonának szekvenciáját mutattuk ki (amelyet Spanyolországban írtak le: García-Pérez és mtsai, 2016). Ennek az ismeretlen kórokozó képességű baktériumnak az első molekuláris azonosítása kutyákban hasonlóan ritka találat volt, (figyelembe véve, hogy 90 kutyából egy volt pozitív), mint amikor eredetileg leírták európai borzból (183 menyétféléből egyben: García-Pérez és mtsai, 2016). A hazai kutyában e helyütt kimutatott genotípus azonban két bázispárral is különbözött 16S rRNS szekvenciájában (amely génszakaszt az Anaplasmataceae család fajain belül nagyon konzervatívnak tartanak: Rar és Golovjova, 2011) a spanyolországitól, ami azt sejteti, hogy ez az *Ehrlichia*-faj Európán belül, az egyes földrajzi régiók között genetikai heterogenitással jellemezhető. Jelen eredményeink alapján érdemes tovább vizsgálni, hogy az *I. canisuga* vektora-e ennek a genotípusnak.

Vizsgálatunk szolgáltatta az első molekuláris bizonyítékot arra vonatkozóan is, hogy egy, a *Ca. N. lotoris* fajhoz közel álló genotípus kutyákban is előfordul. Itt a *Ca. N. lotoris*-szerű szekvenciát hat kutyából, két borzból és egy kullancsból (*I. canisuga*) is kimutattuk. A borzok PCR pozitivitása megfelel korábbi eredményeinknek Kelet-Magyarországról (4.7.5. fejezet). Azonban a délnyugat-magyarországi groEL szekvencia eltérése a kelet-magyarországi, ausztriai és csehországi szekvenciától (Hodžić és mtsai, 2015; 2016) újdonság, különösen annak tükrében, hogy a *Ca. N. lotoris* szekvenciák között nem találtak eltérést az USA-ban (Yabsley és mtsai, 2008a). Ráadásul, a vele közeli rokonságban álló faj, a *Ca. N. mikurensis* konzervatívabb 16S rRNS és változékonnyabb groEL szekvenciái egyaránt homogének Európán belül (Rar és Golovjova, 2011).

A *Ca. N. lotoris* valószínű vektorai a *Phlebotomus* alnembe tartozó kullancsok (Yabsley és mtsai, 2008b). Vizsgálatunk során azonban 19 *I. (Ph.) canisuga* példányból csak egy volt PCR pozitív, noha mindet bacteriaemiás borzról gyűjtöttük. Ez arra utalhat, hogy az *I. (Ph.) canisuga* nem vektora a *Ca. N. lotoris* Hu-2 genotípusnak, vagy alacsony hatásfokkal veszi fel e baktériumokat. Mindazonáltal, a *Phlebotomus* alnem kullancsfajai gyakran fordulnak elő "üreglakó" emlősökön (4.2.2. fejezet), és az ilyen védett búvóhelyekkel való gyakori kontaktus magyarázhatja a *Ca. N. lotoris* Hu-2 szignifikánsan magasabb prevalenciáját vadász- és erdőlátogató kutyákban, ahogy ezt itt kimutattuk.

Vizsgálatunkban *Wolbachia* DNS-t nyolc kutya vérében és egy kullancsban azonosítottunk. A dirofilariosisban szenvedő kutyákról ismert, hogy a keringésükben *Wolbachia* DNS lehet jelen (Rossi és mtsai, 2010). Itt azonban három kutyából olyan wolbachiókat mutattunk ki, amelyek az ízeltlábúakhoz társult genotípusok körébe tartoztak. Noha ízeltlábú-eredetű *Wolbachia* DNS-t nemrég énekesmadarak vérében is azonosítottunk (Hornok és mtsai, 2018), a kutyák vérének hasonló lelete csak nehezen magyarázható; annak ellenére, hogy egyes szimbiontákat a vérszívó ízeltlábúak gazdáikba juttathatnak (Bazzocchi és mtsai, 2013). A *H. concinna* kullancsfajban itt kimutatott *Wolbachia* DNS kullancs eredete

sem bizonyos, mivel az *I. ricinus* kullancsfajból kimutatott *wolbachia* endosymbiontákról is kiderült, hogy parasitoid darazsaktól származnak (Plantard és mtsai, 2012).

Következtetésképpen, kutyák vérében az Anaplasmataceae család tagjainak széles köréből származó DNS lehet jelen, amiről eddig nem volt tudomásunk. Az itt ismertetett eredményeket úgy is értelmezhetjük, mint annak első molekuláris bizonyítékát, hogy a kutyák e három potenciálisan vagy bizonyítottan kórokozóképes baktériumfajjal (*A. marginale*, borz *Ehrlichia*-faj és *Ca. N. lotoris*-szerű genotípus) legalábbis kapcsolatba kerülhetnek. A DNS keringésbeli jelenléte a szóban fogó kutyák fogékonyságát is jelentheti, tehát hogy az e gazdában újak számító kórokozókkal (átmeneti) fertőzöttség alakulhatott ki, de ennek végső bizonyítása további vizsgálatot igényel.

4.6. Kullancsfajok első azonosítása hazánkban és más európai országokban (röviden)

Molekuláris módszerek: A, B

4.6.1. Az *Ixodes ariadnae* első azonosítása Németországban

2015 márciusában egy hosszúlábú denevérkullancsot távolítottunk el egy *Myotis myotis* fajú denevérről Baden-Württemberg tartományban, Németországban. Morfológiai bélyegei (rövid, széles és laterálisan egyenes tapogatók, hullámos felszínű és fordított harang alakú pajzs), illetve COI (KR093169) és 16S rRNS (KR093170) gén szekvenciája alapján e kullancspéldány az *Ixodes ariadnae* faj nőtényének bizonyult. Figyelembe véve a gyűjtési hely földrajzi koordinátáit és a *M. myotis* ismert vándorlási távolságát, ez az adat egyértelműen az *I. ariadnae* németországi autochthon előfordulása mellett szól. Ez volt ennek az újonnan (2014-ben) felfedezett kullancsfajnak az első külföldi megkerülése.

4.6.2. Az *Ixodes ariadnae* első azonosítása Belgiumban

Tizennégy hosszú lábú denevérkullancsot (hat nympját és nyolc lárvát) gyűjtöttünk *Myotis bechsteinii* denevérfajról Rochefort térségében, Belgiumban. A fenti morfológiai bélyegek alapján valamennyi kullancsot *Ixodes ariadnae* fajúként azonosítottuk, amit később felerősített COI szekvenciájuk is megerősített. Ez utóbbiak (KX375410) 100%-os egyezést mutattak egymással, és a korábban Németországban és Magyarországon azonosított haplotípussal. Ez arra utal, hogy a másik európai hosszúlábú denevérkullancs fajjal (*I. vespertilionis*) szemben – amelynek országunkon belül is számos eltérő genetikai változatát azonosítottuk – az *I. ariadnae* genetikailag Európa-szerte meglehetősen homogén. Figyelembe véve, hogy a gyűjtési hely közel van a francia határhoz, és a *M. bechsteinii* mozgása ismert Belgium és Franciaország között (Hutterer és mtsai, 2005), ez utóbbi területén is indokoltan feltételezhetjük az *I. ariadnae* előfordulását. Összességében tekintve ez az *I. ariadnae* első azonosítása korábban ismert földrajzi előfordulásán (Közép-Európa) kívül, Nyugat-Európában.

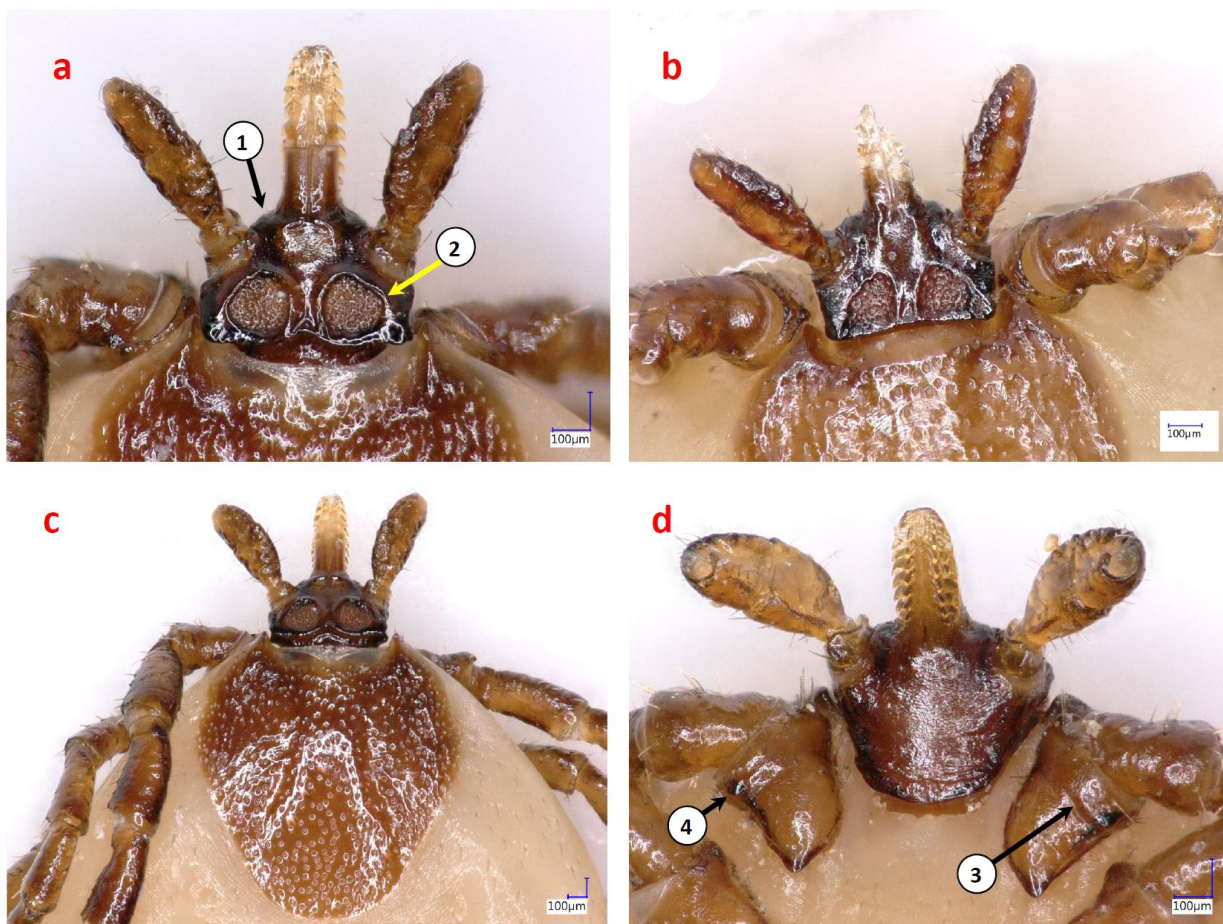
4.6.3. Az *Ixodes festai* első azonosítása Magyarországon

Amikor 2012-2014 között 3339 kullancsot gyűjtöttünk hazai énekesmadarokról – a két leggyakoribb faj, az *Ixodes ricinus* és a *Haemaphysalis concinna* nympjai és lárvái mellett – *Ixodes* nőtényeket is találtunk. Ezek közül kettő az *I. festai* morfológiai bélyegeit mutatta (a pajzs mélyen pontozott, a fej alapi részén dorzálisan feltűnő cornua pár, ventralisan széles, hátra hajló auriculák, és az első csípőkön hosszú belső tüske). Bár elhelyeztük 16S rRNS szekvenciáikat a GénBankban (KU170521, KU170522), mások által közölt szekvencia nem állt rendelkezésre összehasonlításképpen. A két *I. festai* zöldikéről (*Carduelis chloris*) és erdei szürkebegyről (*Prunella modularis*) származott, amelyek feltételezhetően dél-délnyugat felől hozták ezt a Nyugat-Mediterráneumban honos kullancsfajt (Contini és mtsai, 2011).

4.6.4. Az *Ixodes kaiseri* első azonosítása Magyarországon, Németországban és Szerbiában

A *Pholeoixodes* alnembe főként házi és vadon élő ragadozók kullancsfajai tartoznak. A 2003 és 2017 között kilenc európai országban gyűjtött, *Pholeoixodes* alnembe tartozó 144 nőtény kullancs közül 21 példányt *Ixodes kaiseri* fajúként azonosítottunk típuspéldánnyal való összehasonlítás alapján (nincs kifejezett első csípőtövis, de az első csípő felülete mediolaterálisan osztott; a hypostoma tengelye

tompa szöget zár be a fej alapi rész elejével: 4.6.4.1. ábra). Az *I. kaiseri* eddig ismert európai előfordulását bizonytalanság övezi, mivel Lengyelországból csak "hasonló" kullancsokat írtak le (*Ixodes* cf. *kaiseri*: Wodecka és mtsai, 2016), Romániában pedig miután említették e faj előfordulását (Filippova és Uspenskaya, 1973), a későbbi széleskörű, ragadozókat célzó kullancsvizsgálatok egyike sem tudta megerősíteni jelenlétét. Mindazonáltal első alkalommal találtuk meg az *I. kaiseri* fajt Magyarországon, Németországban és Szerbiában, ahol korábban valószínűleg az *I. canisuga* fajjal tévesztették össze.



4.6.4.1. ábra. Az *Ixodes kaiseri* kulcsbélyegei. (a) Fej alapi rész, dorzális aspektus (1 - a fej alapi rész eleje kúp alakú; 2 - a kerekded area porosa peremmel rendelkezik). (b) Egy másik morfortípus fej alapi részének dorsalis aspektusa, háromszögletű area porosával. (c) Pajzs és fej alapi rész. (d) Fej alapi rész és első csípők ventralisan (3 - a csípő felületét megtörő hosszanti vonal; 4 - külső tövis).

4.6.5. A *Haemaphysalis erinacei* első azonosítása Romániában

A *Haemaphysalis erinacei* főként süntények és ragadozók élősködője. Azon kevés kullancsfaj egyike, amelynek nevezéktanában valid (érvényben lévő) alfajok vannak. Az ezeket az alfajokat molekulárisan első ízben összehasonlító vizsgálatunk apropóját az adta, hogy elsőként találtuk meg a *H. erinacei* fajt Romániában. Morfológiailag és molekulárisan (a *cox1* és 16S rRNS gének alapján: KU885986, KU885987) ez a *H. erinacei taurica* alfajba tartozott. Ez a mitochondriális genetikai markerekkel is igazolt legnyugatibb előfordulása ennek az alfajnak, amely irodalmi adatok alapján Közép-Ázsiától Délkelet-Európáig elterjedt.

4.6.6. A *Rhipicephalus sanguineus* első autochthon előfordulása Magyarországon

Bár a *Rhipicephalus sanguineus* hazai előfordulásának feltételezhetően importált esetét már leírtuk (Hornok és Farkas, 2005), nem volt bizonyíték autochthon jelenlétére. E kullancs fajcsoport pán-mediterrán vizsgálatához azonban sikerült találnunk egy 2012-es szekszárdi fertőzöttséget, amelynek

szervedő alanya egy külföldre soha nem vitt kutya volt. A hazai kullancsok genetikailag – *cox1* szekvenciájuk alapján (KX757901) – a Nyugat-Mediterráneumhoz kapcsolódtak. Jóllehet a 2012 óta eltelt időszakban a *Rhipicephalus sanguineus* sporadikus, fokális hazai előfordulásának újabb eseteire is fény derült, és az általa közvetített egyes kórokozók molekulárisan igazolt jelenlétére is van adat (főként határaink mentén, lásd 4.7. fejezet), e kullancsfaj nem tekinthető Magyarországon széles körben honosnak, elterjedtnek; sokkal inkább közös forrásból származó, izolált populációkról beszélhetünk.

4.6.7. A *Hyalomma rufipes* autochthon előfordulása Magyarországon

Délnyugat-Magyarországon (főként Somogy-megye Horvátországgal határos részén) folyamatosan gyűjtünk kullancsokat. Ennek okai egyrészt, hogy a déli határ mentén több új kullancs közvetítette kórokozót is azonosítottunk, másrészt a délnyugati határ mentén van a legnagyobb esély termofil kullancsfajok meghonosodására, mivel itt a legmagasabb a téli átlagos középhőmérséklet (így magasabb hőmérsékletigény esetén itt a legnagyobb az esély a sikeres áttelelésre). Ennek jegyében, 2011 őszén kullancsokat gyűjtöttünk vadon élő kérődzőkről és szarvasmarhákról. Az ismerten hazánkban honos kullancsfajok egyedei (1185 *Dermacentor reticulatus* és 976 *Ixodes ricinus* példány) mellett két hím *Hyalomma rufipes* példányt is gyűjtöttünk (szeptemberben, nyolc nap eltéréssel két szarvasmarháról: 4.6.7.1. ábra).



4.6.7.1. ábra. A *Hyalomma rufipes* kulcsfontosságú bélyegei (hazai példány). Baloldalon a pajzs sűrű pontozottsága, jobb oldalon a légzőnyílások lemeze melletti szőrözöttség.

Ez a trópusi kullancsfaj afrikai eredetű, és a mediterrán térségben is ritka. Humán- és állategészségügyi jelentőségét növeli, hogy a krími-kongói vérzések (CCHF) vírusának vektora. Ez az eredményünk e kullancsfajnak a típusgazdán (szarvasmarhán) való legészakibb autochthon előfordulása. Mivel azóta van rá bizonyíték, hogy a *H. rufipes* nymphái madarakon hazánkba érkeznek (4.2.1. fejezet), viszont kifejlett példányai nem fordulnak elő madarakon, eredményünk azt is igazolja, hogy ez az eredendően afrikai kullancsfaj képes Magyarország kontinentális éghajlati viszonyai között adulttá vedleni. [Megjegyzés: az akkori morfológiai leírás alapján bizonytalan, hogy Kotlán S. (1919) ezt a fajt azonosította-e és említi szarvasmarháról *H. aegyptium*, Babos S. (1965) pedig – Kotlán adatait is figyelembe véve – importált állatokon, vonuló madarakon *H. impressum* néven.]

4.7. Kullancs közvetítette kórokozók első molekuláris azonosítása hazánk illetve Európa vonatkozásában (röviden)

Molekuláris módszerek: D, F, M, I, J; Foley és mtsai, 2007; Maurer és mtsai, 2013; Wengi és mtsai, 2008; Inokuma és mtsai, 2002

4.7.1. Az *Anaplasma marginale* első molekuláris azonosítása Magyarországon

Hazánkban az *Anaplasma marginale* fertőzöttséget importált szarvasmarha állományban már közölték (Dankó és mtsai, 1982). Északkelet-Magyarországon (Domaháza), 2006-ban négy szarvasmarha véreből (vérkenetben talált intraerythrocytaer anaplasma testek, illetve szeropozitivitás megerősítésére) sikeresen szekvenáltuk az *A. marginale* 4-es fő felületi antigénjét kódoló génszakaszt (msp4) (GénBank: EF190508). A szekvenciák 99,4%-ban egyeztek a leginkább hasonló génbanki szekvenciával (AY127073). Mivel helyi, nem importált szarvasmarhákból mutattuk ki az *A. marginale* fajt, ez igazoltan autochthon fertőzöttségnek számít.

4.7.2. Az *Anaplasma ovis* első molekuláris azonosítása Magyarországon

Északkelet-Magyarországon (Domaháza), 2006-ban tavaszi haemoglobinuria jelentkezett juhokban. Öt juh véreből (vérkenet- és szeropozitivitás megerősítésére) sikeresen szekvenáltuk az *A. ovis* 4-es fő felületi antigénjét kódoló génszakaszt (msp4) (GénBank: EF190509-13). A szekvenciák egyike 100%-ban megegyezett egy olaszországi (szicíliai) szekvenciával (AY702923), a többi pedig 2-9 nukleotidban különbözött. Ennek alapján a hazánkban kimutatott *A. ovis* genetikailag sokkal heterogénebbnek bizonyult, mint az *A. marginale*. Ezt követően a szomszédos szlovákiai területeken is megjelent az *A. ovis* (Derdáková és mtsai, 2011).

4.7.3. Az *Ehrlichia canis* első molekuláris azonosítása Magyarországon

Az *Ehrlichia canis* hazai előfordulására utaló molekuláris eredményeket először 2007-ben kaptunk, amikor a 3442 gazdakereső (növényzetről gyűjtött) kullancs közül kettő, Délnyugat-Magyarországon gyűjtött *Ixodes ricinus* nőtényeket tartalmazó pool-minta valós idejű PCR pozitivitást jelzett (az *I. ricinus* nem tartozik az *E. canis* ismert vektori közé). Ezt követően, 2011-ben ugyancsak Dél-Magyarországon, terelő kutyákról és vadon élő ragadozókról gyűjtött 348 kullancs közül négy *Dermacentor marginatus* nymphában (három helyről, négy kutyáról) és három *I. canisuga* lárva pool-mintában (vörös rókákról) RLB módszerrel szintén kimutattuk az *E. canis* fajt. Mivel az Anaplasmataceae család képviselőjeként az *E. canis* nem öröklődik transzovariálisan a következő kullancsnemzedék felé (Dumler és mtsai, 2001), ezért az *I. canisuga* lárvák csak gazdájuktól, a vörös rókáktól fertőződhetnek. Ugyanakkor nem találtunk szakirodalmi adatokat arra vonatkozóan, hogy az *E. canis* öko-járványtanában az európai vörös róka (*Vulpes vulpes*) rezervoár szerepét igazolták volna, így eredményünk ebből a szempontból (ennek indirekt bizonyítékeként) is kiemelt jelentőségű.

4.7.4. Borz *Ehrlichia*-faj első azonosítása Közép-Európában

2017-ben, Délnyugat-Magyarországon (Csurgó) kutyákból gyűjtött 90 vérminta egyikében, és négy, borzról származó *I. canisuga* kullancsban egy korábban csak Spanyolországból ismert borz *Ehrlichia*-fajt mutattunk ki PCR módszerrel és szekvenálással. A hazai minta 16S rRNS génszakasza (GénBank: MH020203) két nukleotid eltérést mutatott a spanyolhoz képest (GénBank: KR262717). E baktérium kórtani hatása nem ismert (részletesebben: 4.5.5. fejezet).

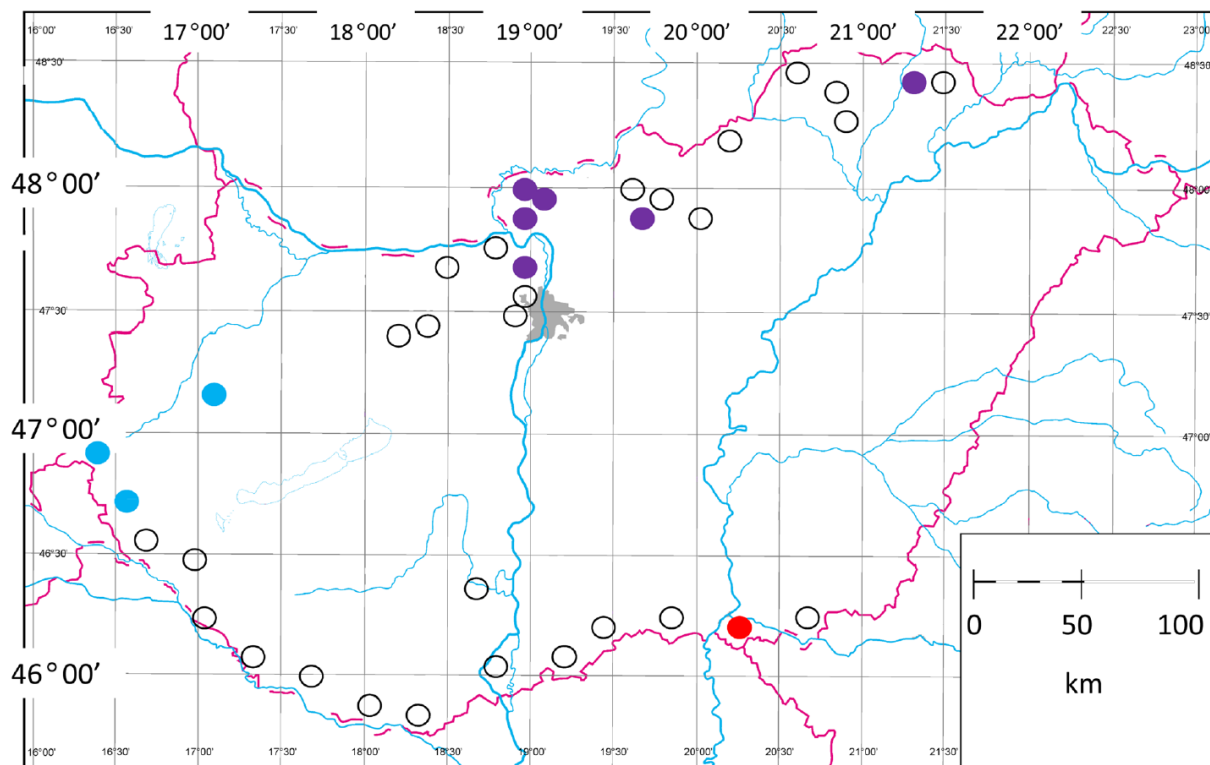
4.7.5. A *Candidatus Neoehrlichia lotoris* első azonosítása Magyarországon és borzban

Egy 2016-ban, a Hortobágy közelében elütött borz vérmintájából első alkalommal tudtuk azonosítani egy olyan baktériumfaj szekvenciáját (GénBank: KX231830), amely az észak-amerikai elterjedésű – ott mosómedvéket fertőző – *Neoehrlichia lotoris* fajhoz genetikailag hasonló (16S rRNS gén: 99,5%

azonosság a EF633744 génbanki szekvenciával). Mivel e fajt korábban Európában csak vörös rókából mutatták ki Ausztriában és Csehországban (Hodžić és mtsai 2015, 2016), ez az adat nemcsak hazánkra nézve új, de nemzetközi szinten első jelentése e baktériumfajnak borzról.

4.7.6. A *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* első azonosítása Magyarországon

Az *Ixodes ricinus* 2007-ben gyűjtött, hazánk 37 helyéről származó 2004 példányát vizsgáltunk molekulárisan (valós idejű PCR segítségével) az e kullancsfaj által közvetített zoonótikus kórokozó, a *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* jelenlétére. E baktériumfajt három régió kilenc helyén azonosítottuk, illetve további – faji szinten nem azonosítható – genus szintű rokonait hét helyen (4.7.5.1. ábra).



4.7.6.1. ábra. A *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* (kék és lila körök), illetve az ebbe a nembe tartozó, de nem fajazonos baktériumok származási helye (piros és lila körök).

4.7.7. A tudományra új *Candidatus Rickettsia hungarica* molekuláris azonosítása

A 2007-ben gyűjtött 3442 gazdakereső kullancsból 315 példányt *Haemaphysalis inermis* fajúként azonosítottunk. Ezek *pool* DNS mintái közül egyből eddig ismeretlen rickettsia szekvenciát nyertünk, amely hosszabb (712 bp) citrát-szintáz (*glTA*) génszakaszában legfeljebb 95,8%-ban egyezett már ismert és génbanki adatokkal közölt *Rickettsia*-fajokkal. A *Candidatus Rickettsia hungarica* nevet javasoltuk ennek a valószínűleg új fajnak (GénBank: EU853834). Új faji státuszát mindmáig nem cáfolták meg, és a *Candidatus R. hungarica* azóta előkerült a szomszédos Szlovákiából is (Špitalská és mtsai, 2018). Mivel filogenetikailag ez az új faj-jelölt a rickettsiák foltos láz csoportjába (SFG) tartozik, és azon belül a fajok átlagosan 2,3%-ban térnek el egymástól (Regnery és mtsai, 1991), a *Candidatus R. hungarica* 4,2%-os eltérése a hozzá legközelebb álló fajtól alátámasztja önálló státuszát.

4.7.8. A *Rickettsia massiliae* első azonosítása Magyarországon

A 2011-ben Dél-Magyarországon ragadozókról gyűjtött 348 kullancs közül egy terelő kutyáról származó *Dermacentor marginatus* nymphában RLB módszerrel orvosi szempontból fontos – de kutyákat is fertőző – kórokozó, a *Rickettsia massiliae* jelenlétét igazoltuk (e kullancsfajban a világon először). A *R. massiliae* ismert vektora a *Rhipicephalus sanguineus* (amelynek hazai előfordulása sporadikus: 4.6.6.

fejezet). E *Rickettsia*-faj földrajzi elterjedtségének leírt északi határa hazánkhoz legközelebb Dél-Svájc (Ticino tartomány: Bernasconi és mtsai, 2002), azonos északi szélességen (46°) Dél-Magyarországgal.

4.7.9. A *Rickettsia aeschlimannii* első azonosítása Magyarországon

2011-ben 184 preadult kullancsot gyűjtöttünk gyűrűzésre ideiglenesen befogott énekesmadarokról. Három, vörösbegyőről (*Erithacus rubecula*) eltávolított kullancsot molekulárisan (a 16S rRNS gén szekvenálása alapján) *Hyalomma marginatum* fajúként azonosítottunk. A *H. marginatum* DNS mintájában PCR és szekvenálás (a *gltA* gén rövidebb, 381 bp hosszú szakasza) alapján a *Rickettsia aeschlimannii* fajt mutattuk ki, amely 100%-ban egyezett egy egyiptomi izolátummal (GénBank: HQ335153). E humán jelentőségű kórokozó Európa mediterrán részében honos (Fernández-Soto és mtsai, 2003). Eredményünk fontosságát nemzetközileg is növeli, hogy ez az első eset, amikor a Mediterráneumtól északra urbanizált, kertekben gyakori (tehát synanthrop) madárfaj kullancsából sikerült e kórokozót kimutatni, így ennek az adatnak az ember fertőződése szempontjából kiemelt járványtani jelentősége lehet.

4.7.10. A *Rickettsia africae* első autochthon előfordulása Európában

2008 és 2016 között 307 kullancsot és 323 óvantagot gyűjtöttünk denevérekről. Ezek *vector-borne* baktériumok jelenlétére irányuló molekuláris vizsgálatának legfontosabb eredménye a *Rickettsia africae* azonosítása volt (712 bp *gltA*: MH383139; 99,9-100% egyezés a CP001612 és HM538186 génbanki szekvenciákkal), amely egy hazai *Argas vespertilionis* mintában volt jelen. Ez az óvantag Gemenc térségéből származott *Myotis dasycneme* denevérfajról, amely a Mediterráneumtól északra fordul elő és nem vándorol Afrika és Európa között. Így ez az első molekuláris bizonyíték a *R. africae* egy genetikai változatának autochthon európai előfordulására vonatkozóan. E fontos kórokozó Afrikában az ember kiütéses bőrelváltozással és lázzal, myalgiaival járó kórképét ("African tick-bite fever") okozza (Fournier és mtsai, 2009).

4.7.11. A kutya haemoplasmáinak első molekuláris azonosítása Magyarországon

A kutya *Mycoplasma haemocanis* (régén: *Haemobartonella canis*) fertőzöttségét vérkenetben már igazolták Magyarországon (Máthé és mtsai, 2006). 2012 nyarán vérmintákat gyűjtöttünk 100 terelő kutyából, 12 vadászkutyából és 14 kóbor kutyából 24 helyen hazánk déli határa mentén. Tizennégy kutyát haemoplasma fertőzöttnek találtunk: ezek közül a *Candidatus M. haematoparvum* DNS-e mindegyikben jelen volt, míg a *M. haemocanis* fajt nyolc mintában. E két kutya haemoplasmával való autochthon fertőzöttség Európában csak a mediterrán térségre – azon belül észak felé csökkenő prevalenciával – jellemző, mivel ott tekinthető honosnak vektoruk, a *Rhipicephalus sanguineus* kullancsfaj (Novacco és mtsai, 2010).

4.7.12. Borzélősködő *Babesia*-faj első azonosítása Magyarországon

A 2016-ban, a Hortobágy közelében elütött borz vérmintájából kivont DNS piroplasma pozitív volt. Ennek háttérében szekvenálással egy *Babesia*-fajt találtunk (GénBank: KX218234), amely 99,1%-ban azonos volt egy borz *Babesia*-fajjal Spanyolországból (Burgos) (GénBank: FJ225390, Gimenez és mtsai, 2009). Figyelembe véve a magyar adattal egy évben közölt angol eredményeket, ez a faj (*Babesia* sp. Meles-Hu1) a *Babesia* sp. borz A-típusba tartozik, és a rágcsálókban előforduló *B. microti* filogenetikai csoportjának tagja (tehát *sensu stricto* nem *Babesia*-faj).

4.7.13. Egy *Babesia crassa* genotípus első azonosítása Európában

A 2007-ben gyűjtött 315 *Haemaphysalis inermis* példány 64 pool mintájából 19-ben egy olyan babesia genotípust azonosítottunk, amely leginkább a *Babesia crassa* fajhoz volt hasonló (18S rRNS génszakasz: 98,6% azonosság a génbanki KF791205 szekvenciával). Ez a genotípus (KT725848) a Pilis hegység, a Börzsöny és Szekszárd térségében is előfordult. Filogenetikai viszonyait a 4.7.13.1. ábra mutatja. A *B. crassa* juhban (kecskében) enyhén patogén és valószínűsíthető vektorai *Haemaphysalis*-fajok

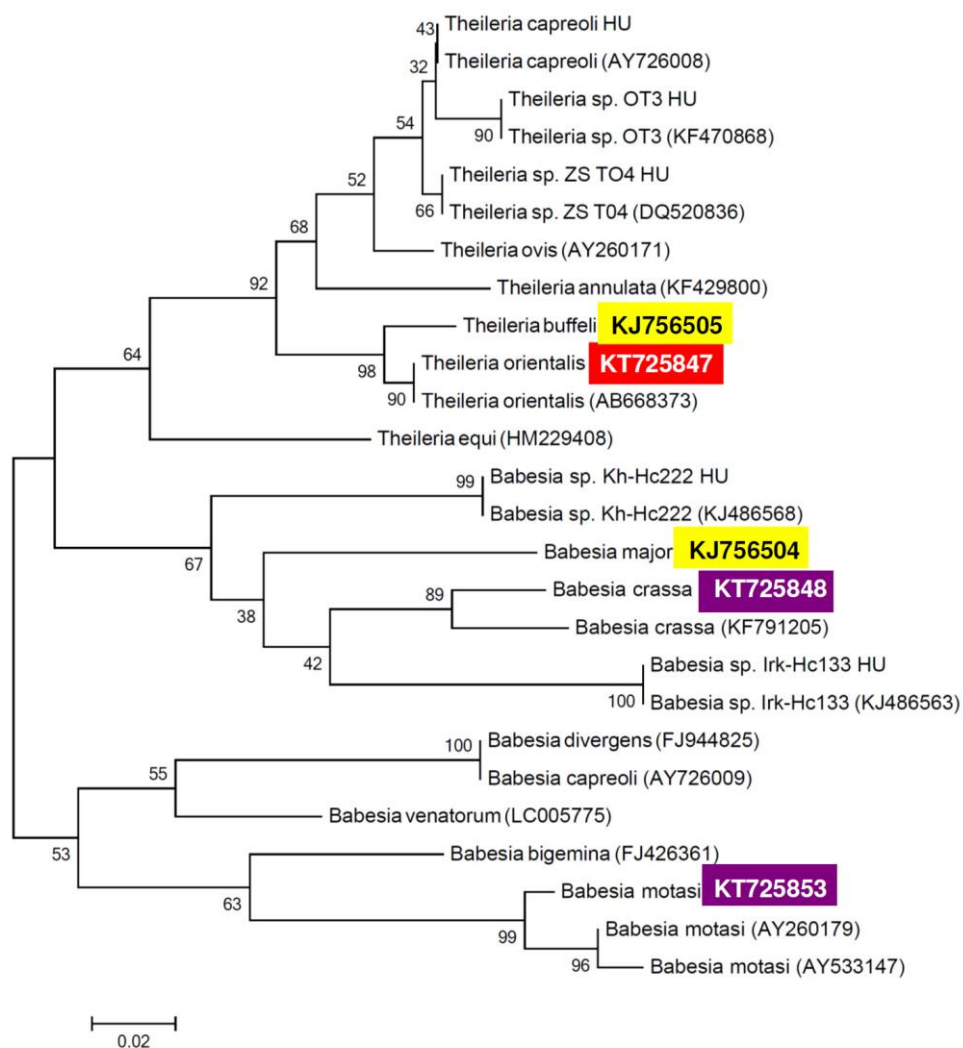
(Hashemi-Fesharki és Uilenberg, 1981). Korábban ismert előfordulási területe a Közel-Kelet térsége (Schnittger és mtsai, 2003).

4.7.14. A *Babesia motasi* első molekuláris azonosítása Közép-Európában

A 2007-ben gyűjtött 259 *Haemaphysalis concinna* példány 53 pool mintájából ötben (csak nőstényekben) a *Babesia motasi* fajt mutattuk ki (18S rRNS génszakasza alapján 99,3%-ban azonos az AY260179 génbanki referencia szekvenciával). E hazai genotípus (KT725853) filogenetikai viszonyait a 4.7.13.1. ábra mutatja. Valamennyi pozitív minta a Börzsönyből származott. A *B. motasi* kiskérődzőkben (főleg juhban) mérsékelten patogén. Jellemzően Észak-, Nyugat- és Dél-Európában fordul elő, ahol vektora a *H. punctata* (Uilenberg és mtsai, 1980). Ez az első kimutatása *H. concinna* kullancsfajból.

4.7.15. A *Babesia major* első molekuláris azonosítása hazánkban

2013-ban, egy északkelet-magyarországi (mátranováki) kis létszámú húsmarha állomány öt egyedében *Babesia major* fajt mutattunk ki (amely 18S rRNS génszakaszában 99,8% azonosságot mutatott a GU194290 génbanki számú francia genotípussal). E hazai genotípus (KJ756504) filogenetikai viszonyait a 4.7.13.1. ábra mutatja. Az öt fertőzöttnek talált szarvasmarha közül három a babesiosisra jellemző tüneteket mutatott (oedema illetve haemoglobinuria, elfekvés), és két egyed 2-4 héten belül elhullott. A *B. major* általában tünetmentes fertőzöttséget okoz vagy enyhe lefolyású kórképet, szemben az itt megfigyelt két esettel (amelyeknél az anaplasmosis synergista szerepét kizártuk). Ez a piroplasma főként Nyugat-Európában van jelen (például: Purnell, 1978), és vektora a *Haemaphysalis punctata*.



4.7.13.1. ábra (előző oldal). A szarvasmarhában (sárga: Mátranovák; piros: Pásztó) illetve gazda-kereső *Haemaphysalis* kullancsokban (lila szín) azonosított piroplasmák filogenetikai viszonyai.

4.7.16. A *Theileria orientalis* első azonosítása Közép-Európában

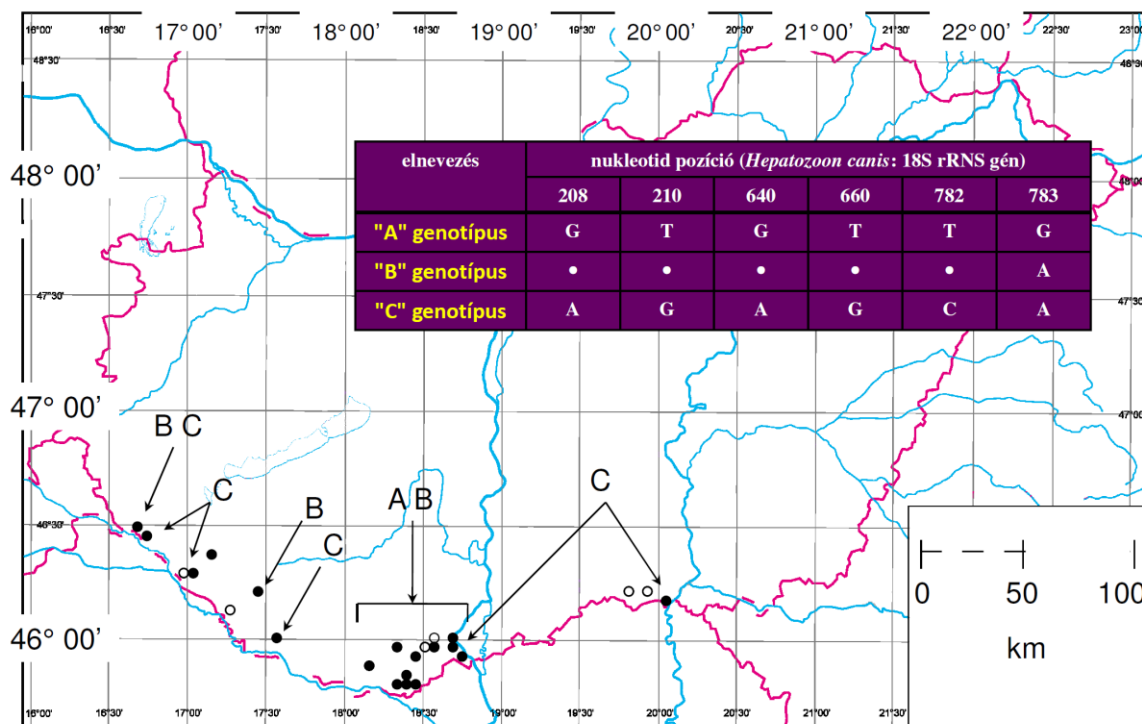
2015-ben, egy másik északkelet-magyarországi (pásztói) kis létszámú húsmarha állomány 52 tehenében *Theileria orientalis* fajt mutattunk ki. Ez 18S rRNS génszakasza alapján 100%-ban egyezett ázsiai, távol-keleti izolátumokkal (például Japánban szarvasmarhából: AB668373). E hazai genotípust (KT725847) génbanki adatok szerint Európában csak Észak-Olaszországban találták meg (KP231341); összes többi közlése távolabbról származik (Tajvan, Kína, Japán, USA és saját vizsgálatunk szerint Etiópia). Filogenetikai viszonyait a 4.7.13.1. ábra mutatja. A *T. orientalis* többnyire enyhe lefolyású fertőzöttséget okoz, de újabban járványszerű megbetegedési hullámok jelentkezését is leírták, például Ausztráliában (Kamau és mtsai, 2011). Bár ismert, hogy e fajkomplex vektorai *Haemaphysalis*-fajok, a feltételezhető vektort az érintett állomány közelében (a vizsgált kullancsok PCR negativitása miatt) eddig nem sikerült azonosítani.

4.7.17. A *Theileria buffeli* első azonosítása Közép-Európában

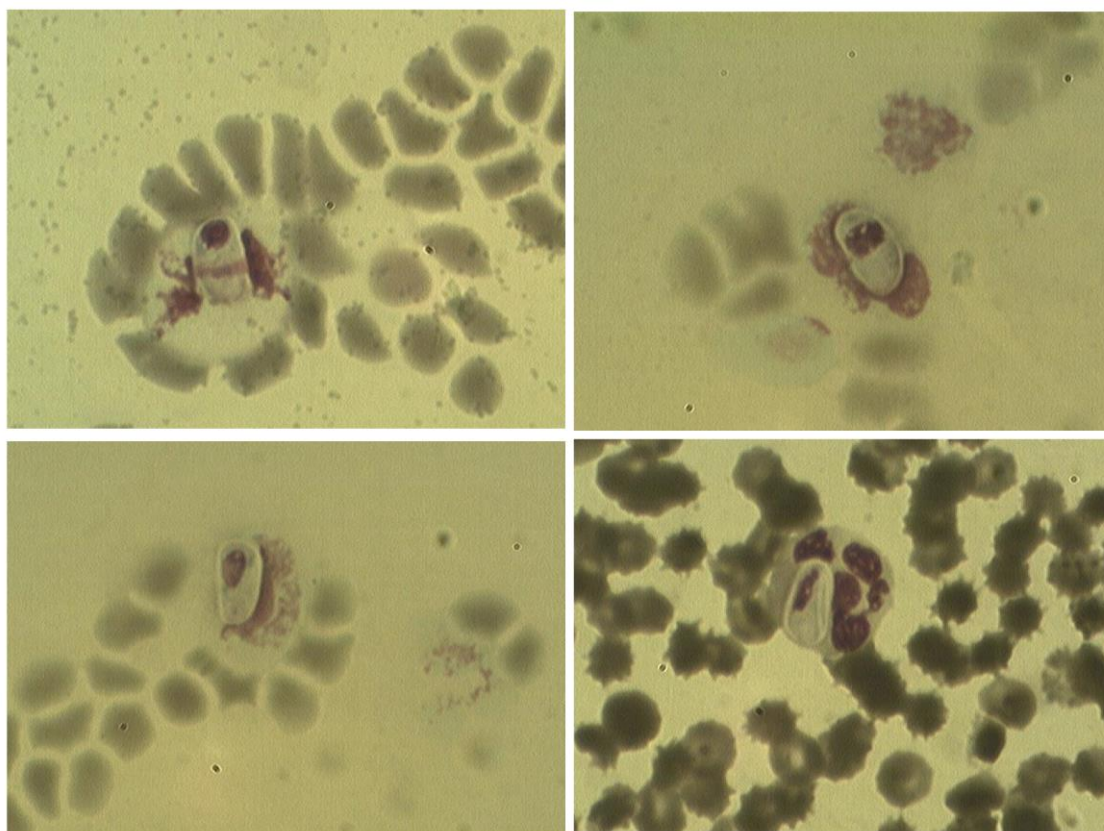
A 2013-ban vizsgált északkelet-magyarországi (mátranováki) húsmarha állomány két egyedében *Theileria buffeli* fajt mutattunk ki (amely 18S rRNS génszakasza szerint 99,8%-ban egyezett a DQ287959 génbanki számú spanyol genotípussal). E hazai genotípus (KJ756504) a *T. orientalis* fajkomplexbé tartozik; filogenetikai viszonyait a 4.7.13.1. ábra mutatja. A fertőzöttnek talált két tehen egyike anaemiás volt. A *T. buffeli* előfordulását korábban – legjobb tudomásunk szerint – csak Nyugat- és Dél-Európából jelentették (például Gubbels és mtsai, 2000), így magyarországi előfordulása az első közép-európai adat.

4.7.18. A *Hepatozoon canis* első azonosítása Magyarországon

Mivel Horvátország Magyarországgal szomszédos területeiről 2009-ben a *Hepatozoon canis* 4-21%-os prevalenciájú előfordulását jelentették (Vojta és mtsai, 2009), 2012-ben hazánk déli határa mentén vérmintákat gyűjtöttünk 100 terelőkutyából, 12 vadászkutyaéból és 14 kóbor kutyaéból (összesen 24 helyen). Ezen minták 26%-ában azonosítottuk PCR és szekvenálás segítségével a *He. canis* fajt, főleg a Dunától nyugatra gyűjtött mintákban (4.7.18.1. ábra). A prevalencia legmagasabb (31%) terelő kutyákban volt. Az egyik genotípus ("A") azonos volt az AY150067 számú génbanki szekvenciával (Spanyolországból), a többi pedig egy vagy hat helyen különbözött (ami 0,2-0,9% különbségnek felel meg) (4.7.18.1. ábra). E protozoon jelenlétét vérkenetben is igazoltuk (4.7.18.2. ábra). A kutyákról eltávolított 83 *Dermacentor*- és *Haemaphysalis concinna* fajú kullancs közül 46 PCR pozitív volt. Mivel PCR pozitív *Ha. concinna* kullancsot két esetben is PCR negatív kutyaőról távolítottunk el, és szintén két esetben a *Haemaphysalis* kullancsokban azonosított *Hepatozoon* genotípus különbözött attól, amelyet az adott kullancsral fertőzött kutya véreben találtunk, a *Ha. concinna* potenciális vektor szerepe további vizsgálatot érdemel. A *He. canis* fontos és ismert európai kullancs vektora ugyanis a *Rhipicephalus sanguineus*, amely csak sporadikusan fordul elő Magyarországon, és sem a vizsgált kutyákon, sem a déli határ mentén nem találtuk meg. Így ez az eredményünk nemzetközi szempontból is figyelemre méltó, mert az első adat, hogy a *He. canis* akár magas prevalenciával is előfordulhat olyan európai térségben, ahol ismert vektora nem honos (vö. szomszédos horvátországi területeken a vektor jelenlétében a prevalencia alacsonyabb, 4-21% volt).



4.7.18.1. ábra. A hazánkban kimutatott *Hepatozoon canis* genotípusok gyűjtési helyei (telt körök), szekvencia változatossága.



4.7.18.2. ábra. Hazai kutyák vérkenetében először kimutatott elliptikus *Hepatozoon canis* gamonták, amelyek a neutrophil granulocyták magját kitakarják. Giemsa-festés (1000x).

4.8. Kullancs- és óvontagfajok, valamint általuk közvetített kórokozók összehasonlítása tágabb földrajzi értelemben

4.8.1. Denevérkullancs-fajok genetikai heterogenitása Euráziában

Előzmények

A denevérekre mint gazdákra specializálódott kullancsok (Acari: Ixodidae) csak az Óvilágban fordulnak elő. Euráziában, 2014 előtt három ilyen "denevérkullancs-faj" létezése volt ismert: ezek az *Ixodes vespertilionis* Koch, 1844, az *I. simplex* Neumann, 1906 és az *I. kopsteini* Oudemans, 1925 (Arthur, 1956; Robbins és mtsai, 2004). Nemrég azonban egy új fajt azonosítottunk *I. ariadnae* Hornok, 2014 néven (4.1.1. fejezet). Úgy tűnik, e négy faj gazdapreferenciája különbözik: az *I. vespertilionis* főként *Rhinolophus*-fajokon (Arthur, 1956; Piksa és mtsai, 2014), az *I. ariadnae* *Myotis*-fajokon (4.5.2. fejezet), míg az *I. simplex* a *Miniopterus schreibersii* denevérfajon (Arthur, 1956), az *I. kopsteini* pedig a Molossidae család képviselőin fordul elő (Robbins és mtsai, 2004). Így a szóban forgó denevérfajok földrajzi elterjedtségének határai, vándorlási szokásai, élőhely különbségei és hibernációs magatartása jelentősen befolyásolja kullancsaik földrajzi előfordulását. Az *I. vespertilionis* és az *I. simplex* is szerepel a világ legszélesebb körben elterjedt kullancsfajai között, mivel előfordulnak az Óvilág legnagyobb részében (Európától Dél-Afrikáig és Ausztráliáig éppúgy, mint keleti irányban Ázsia legtávolabbi részéig: Japánig). Azonban, mindezek ellenére, nem végeztek (nem közöltek) filogeográfiai vizsgálatot arra vonatkozóan, hogy e két kullancsfaj széles elterjedtségi körén belül morfológiailag illetve genetikailag mennyire egységes.

Korábban megállapítottuk, hogy az *I. vespertilionis* kullancsfajnak allopatrikus (térben elkülönült) genotípusai léteznek még egy országon belül is, egymástól távoli barlangok között (4.3.5. fejezet). Azzal a céllal végeztük jelen vizsgálatunkat, hogy kiderítsük: ez a tendencia érvényesül-e nagyobb távolságban is. Ehhez denevérkullancsok mitochondrialis genetikai markereinek heterogenitását mértük fel Eurázsia távoli térségeiből származó példányokból, amelyek az *I. vespertilionis*, az *I. simplex* és az *I. ariadnae* morfológiai jegyeit mutatták. Ugyanakkor Dél- és Délkelet-Ázsiából korlátozott számban álltak rendelkezésre kullancsok, mivel ott azok meglehetősen ritkák (Yamauchi és Funakoshi, 2000).

Molekuláris módszerek: A, B

Eredmények

Európai denevérkullancsok összehasonlítása

A Közép- és Kelet-Európa (KKE) négy országában gyűjtött *I. vespertilionis* példányok között nem találtunk nyilvánvaló morfológiai különbséget. A COI gén felerősített szakasza legfeljebb nyolc nukleotid (98,7%) különbséget mutatott az izolátumok között. A törzsfán ezek a genotípusok együtt csoportosultak, de külön a nyugat-európai, Franciaországban gyűjtött mintáktól (4.8.1.1.a ábra). Ez utóbbiak akár 15 nukleotidban is eltértek, ami csupán 97,6% szekvencia azonosságot jelent a KKE genotípusokkal.

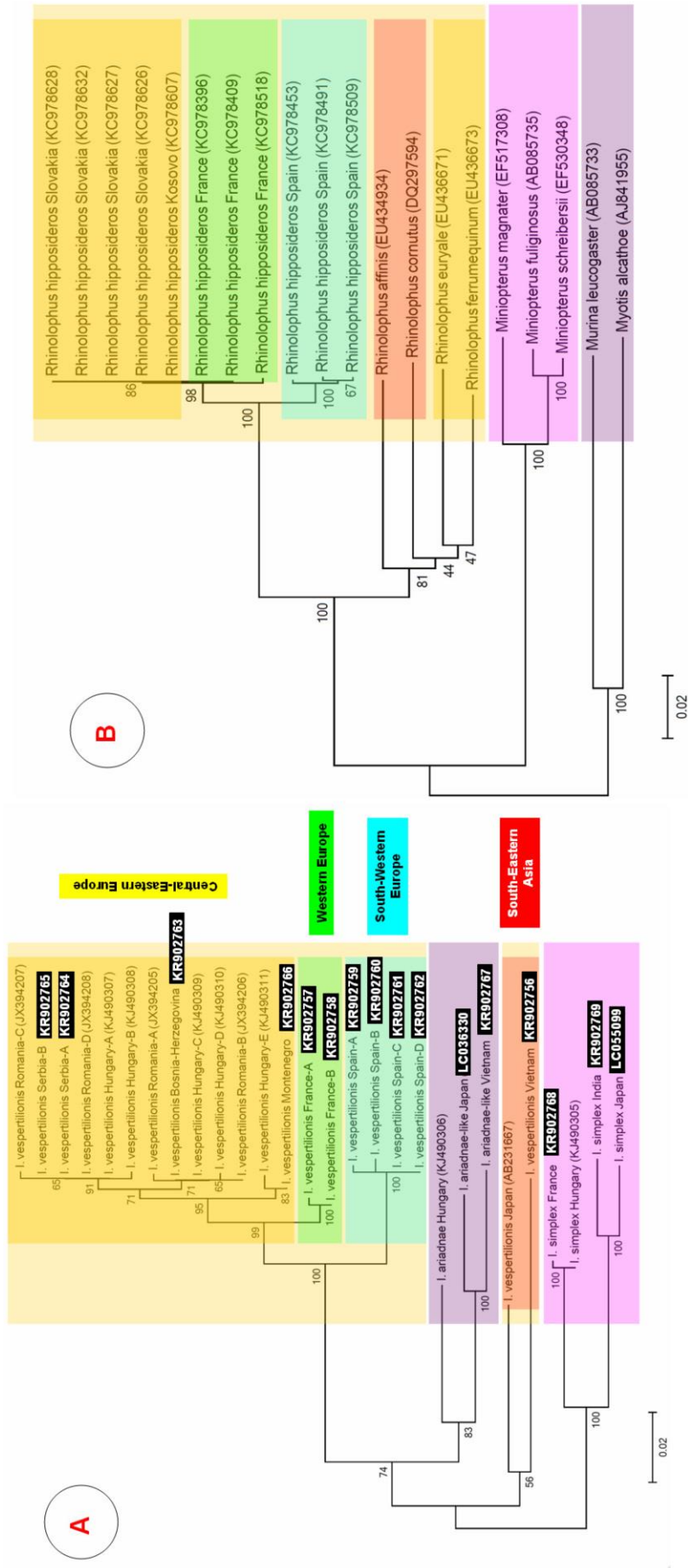
A Spanyolországból származó *I. vespertilionis* példányok morfológiailag szintén azonosnak tűntek a KKE országaiban gyűjtöttekkel. E délnyugat-európai minták COI haplotípusai azonban akár 34 nukleotid eltérést is mutattak az utóbbiakhoz képest, ami mindössze 94,6%-os azonosságot jelent a két kontinentális régió haplotípusai között. A filogenetikai vizsgálatban a délnyugat-európai izolátumok külön kládot alkottak, az összes többi európai minta testvércsoportjaként (4.8.1.1.a ábra). Ez hasonló volt ahhoz, ahogy az *I. vespertilionis* fő gazdáinak, a *R. hipposideros* denevérfajnak a genotípusai elhelyezkedtek (4.8.1.1.b ábra).

4.8.1.1. táblázat. A felmérésben szereplő denevérkullancsok gyűjtési adatai. A DNS kivonását mindegyik mintából vagy annak egy részéből megkíséreltük, de a génbanki hozzáférési szám csak abban az esetben van feltüntetve, ha a COI génszakasz amplifikációja sikerült. A 16S és 12S rRNS szekvenciák hozzáférési számai a szövegben szerepelnek. Rövidítések: F – nőstény; M – hím; N – nympha; L – lárva; ca. – körülbelül.

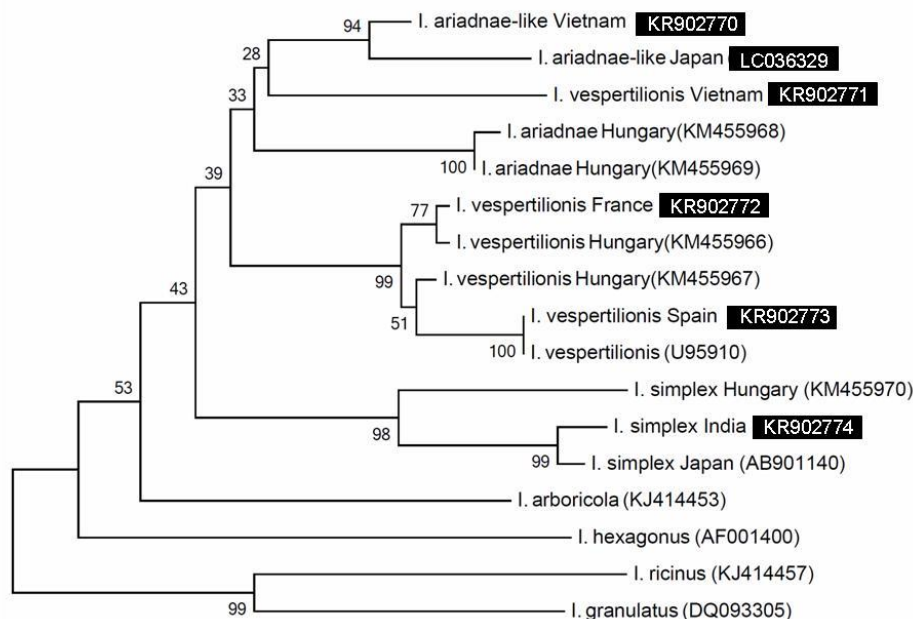
Kullancsfaj (morfológiailag)	Stádium, ivar	Gazdafaj	Dátum (gyűjtés)	Gyűjtés helye: ország (város vagy régió)	COI génbanki szám
	F	<i>Myotis mystacinus</i>	20-05-2010	Szerbia (Zlot)	KR902765
	N	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	03-05-2013	Szerbia (Dimitrovgrad)	KR902764
	F, F	(barlangfal)	1907*	Szerbia (Novi Pazar)	-
	N	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	07-09-2014	Bosznia-Hercegovina (Šipovo)	KR902763
	N	<i>Rhinolophus</i> sp.	1899*	Bosznia-Hercegovina (43.2° N, 17.8°E)	-
	N	<i>Rhinolophus euryale</i>	22-09-2013	Montenegro (Rijeka Crnojevića)	KR902766
	F	<i>Rhinolophus hipposideros</i>	19-09-1913*	Csehország (Hranice na Morave)	-
	M, F	<i>Rh. hipposideros</i> közelében	21-02-2008	Franciao. (Ruillé en Champagne)	KR902757-8
	F	<i>Rhinolophus</i> sp.	ca. 1992	Spanyolo. - Vasque	KR902759
	N	<i>Rhinolophus</i> sp.	ca. 1992	Spanyolo. - Vasque	KR902760
	N	<i>Rhinolophus</i> sp.	ca. 1992	Spanyolo. - Vasque	KR902761
	L	<i>Rhinolophus</i> sp.	ca. 1992	Spanyolo. - Vasque	KR902762
	M	(barlangfal)	1890*	Oroszo. (Kaukázus - Labinsk)	-
	N	<i>Rhinolophus affinis</i>	20-10-2014	Vietnám (Cao Bang - Phia Oac)	KR902756
	L	<i>Myotis</i> n. sp. (nem leírt)	17-10-2014	Vietnám (Thanh Hoa - Ban Vin)	KR902767
<i>I. ariadnae</i>-szerű	F	<i>Murina leucogaster</i>	09-03-2013	Japán (Okayama)	LC036330
	F	<i>Mi. schreibersii</i> (közelében)	09-07-2008	Franciao. (Rancogne)	KR902768
<i>I. simplex</i>	N	<i>Miniopterus magnater</i>	19-02-2015	India (Meghalaya - Jaintia dombság)	KR902769
	-	<i>Miniopterus fuliginosus</i>	09-09-2013	Japán (Wakayama)	LC055099

* A Berliini Természettudományi Múzeum bocsátotta rendelkezésre.

4.8.1.1. ábra. A denevérkullancsok (A) és gazdáik (B) filogenetikai viszonyai (A) COI illetve a (B) citokróm-b gének alapján. Az egyes denevérkullancs-fajokat és a nekik megfelelő gazdakört azonos háttérszín jelöli.



Ennek megfelelően, a 16S rRNS gén felerősített szakasza alapján is a francia izolátum (GénBank: KR902772) a KKE-i mintákkal együtt csoportosult, de mindezek a spanyoltól (GénBank: KR902773) külön, bár ez utóbbi támogatottsága alacsony volt (4.8.1.2. ábra). A spanyol *I. vespertilionis* minta elkülönült filogenetikai helyzetét a 12S rRNS gén is megerősítette, mert a francia haplotípus (GénBank: KR902776) csak három bázispár eltérést (vagyis 99%-os szekvenca azonosságot) mutatott a KKE-ban gyűjtött azonos fajú mintákhoz képest, míg a spanyol minta (GénBank: KR902777) kilenc nukleotid eltéréssel csak 97,5%-ban egyezett velük.



4.8.1.2. ábra. A denevércullancsok filogenetikai viszonyai 16S rRNS génjük alapján (inverz szín: saját minták).

Dél- és kelet-ázsiai denevércullancsok összehasonlítása

A Vietnámban gyűjtött *I. vespertilionis* (4.1.2. fejezet: új fajként leírva *I. collaris*) nympa COI szekvenciája (GénBank: KR902756) a vizsgálatunk során kapott legnagyobb fokú, fajon belüli genetikai eltérést mutatta: a KKE-i *I. vespertilionis* haplotípusoktól akár 101 bázispárnyit, tehát szekvenca azonossága ez utóbbiakkal csupán 84,1%-os volt, és ennek megfelelően a törzsfán külön is csoportosult (4.8.1.1.a ábra). Ez a vietnámi nympa – szekvenciája alapján – a legközelebbi rokonságban (88%) egy korábban publikált japán izolátummal állt (GénBank: AB231667) (4.8.1.3. ábra). Felerősített 16S rRNS szekvenciája alapján (GénBank: KR902771) minden európai *I. vespertilionis* mintától külön helyeződött, annak a két ázsiai kullancsnak a testvércsoportjaként, amelyek leginkább az *I. ariadnae* fajra hasonlítottak (4.8.1.2. ábra).

Egy másik kullancsot is gyűjtöttünk Vietnámban, egy még le nem írt, *Myotis* nembe tartozó denevérfajról. Ez a lárva morfológiailag leginkább az *I. ariadnae* fajra hasonlított. Ennek megfelelően, COI szekvenciája (GénBank: KR902767) legnagyobb mértékben (89,5%) a KKE-i *I. ariadnae* haplotípus-sal egyezett (62 nukleotid különbséggel) és csak 85,2%-ban volt azonos a KKE-i *I. vespertilionis* haplotípusokkal (maximum 87 bázispár különbséggel). A COI filogenetikai elemzés ezt az *I. ariadnae*-szerű vietnámi kullancsot az európai *I. ariadnae* közelébe helyezte, de külön a KKE-i *I. vespertilionis* haplotípusoktól (4.8.1.1.a ábra). Ezt az eredményt a 16S rRNS génre épülő törzsfá csak részben erősítette meg (kis támogatottság mellett), mivel a vietnámi *I. ariadnae*-szerű minta (KR902770) mind az *I. ariadnae*, mind az *I. vespertilionis* KKE-i mintáitól külön csoportosult (4.8.1.2. ábra). A 12S rRNS

gén felerősített szakaszában e lárva (KR702775) csak 12-14 nukleotid különbséget (tehát 96-96,6% azonosságot) mutatott az *I. ariadnae* fajjal, míg 19-20 nukleotid különbséget (94,3-94,6% azonosságot) az *I. vespertilionis* fajjal.

Egy Japánban, *Murina leucogaster* denevérfajról gyűjtött nőtény kullancsot szintén az *I. ariadnae* morfológiai bélyegei jellemezték. E minta COI szekvenciája (LC036330) 65 nukleotidban különbözött a KKE-i *I. ariadnae* haplotípustól (ami 89,7% azonosságot jelent), de a KKE-i *I. vespertilionis* példányoktól való különbsége elérte a 85 nukleotidot (ami csak 86,4%-os azonosságnak felel meg). A COI filogenetikai elemzés alapján ez a japán *I. ariadnae*-szerű kullancs a fenti vietnámi *I. ariadnae*-szerű kullancs rokona, és ezek a magyar *I. ariadnae* közelében – ugyanakkor a KKE-i *I. vespertilionis* haplotípusoktól külön – helyezkedtek el (4.8.1.1.a ábra). Ezt az eredményt a 16S rRNS gén alapú törzsfá is megerősítette (LC036329, 4.8.1.2. ábra). E kullancs 12S rRNS génszakasza (LC036328) az *I. ariadnae* fajéhoz képest 15-17 bázispárban különbözött (95,4-95,9% azonosságot mutatott), míg az *I. vespertilionis* fajjal való összehasonlításban ez 20-21 bázispár különbség (94,3-94,6% azonosság) volt. A nagymértékben eltérő *I. vespertilionis* és *I. ariadnae* haplotípusok COI szekvenciák alapján számolt genetikai távolságát a 4.8.1.3. ábra foglalja össze.

Egy nympa, amelyet *Miniopterus magnater* denevérfajról gyűjtöttek Indiában, az *I. simplex* kullancsfajhoz hasonló felépítésű volt. E minta COI szekvenciája (KR902769) 55-58 nukleotid különbséget mutatott két európai haplotípustól (ami 90,8-91% azonosságnak felel meg), és ez utóbbiaktól filogenetikailag is jól elkülönült (4.8.1.1.a ábra). Ennek megfelelően az indiai *I. simplex* haplotípus (KR902774) és a magyar a 16S rRNS génre épülő törzsfán is elvált, magas támogatottság mellett (4.8.1.2. ábra).

Egy Japánban, *Mi. fuliginosus* denevérfajról gyűjtött *I. simplex* nőtényt is megvizsgáltunk. Ennek COI szekvenciája (LC055099) csak 25 nukleotidban különbözött a fenti, indiai haplotípustól (vagyis 96%-ban volt azonos vele). Filogenetikai összehasonlításban ez a két ázsiai *I. simplex* példány együtt csoportosult, a két európai (francia és magyar) mintától külön (4.8.1.1.a ábra). Ugyanez az elrendeződés jellemezte a japán *I. simplex* minta környezetében (AB901140) a 16S rRNS törzsfát (4.8.1.2. ábra). Másfelől, a japán *I. simplex* 12S rRNS gén szekvenciája (LC055100) 24 nukleotidban eltért a magyar fajazonos mintáétól (ami 93,6% egyezésnek felel meg).

Megbeszélés

Vizsgálatunk eredményei evolúciós hatóerők és események, illetve ökológiai jellemzők fényében értelmezhetők, amelyek az állatfajok populációinak – ez esetben kullancsfajok és denevér gazdák – fajon belüli és fajok közötti genetikai sokféleségét befolyásolják. Ebben az összefüggésben a denevérfajok kontinentális elterjedtsége, a földrajzi választóvonalak és jegesedési periódusok (amelyek elválaszthatják a rokon denevérpulációkat) különösen fontosak lehetnek mint az elválasztó szelekciót befolyásoló tényezők. Mindazonáltal, a vizsgálatunkban használt kullancsok, fejlődési stádiumok alacsony száma nem teszi lehetővé, hogy a gyűjtött egyedek pontos taxonómiai helyére minden esetben következtethessünk. Azonban a minták alacsony számát kompenzálja azok reprezentatív területi eloszlása és az egy helyről származó minták egyöntetűsége.

Az *I. vespertilionis* kullancsfaj fő gazdája Európában a *R. hipposideros* (Arthur, 1956; Piksa és mtsai, 2014). A postglacialis periódusokban e denevérfaj Közép- és Észak-Európát a Balkán vagy az Észak-Mediterráneum (így Dél-Franciaország) refúgiumaiból népesíthette be ismét (Dool és mtsai, 2013). Ez magyarázhatja a KKE-i és francia *I. vespertilionis* izolátumok relatív genetikai homogenitását jelző eredményeinket.

Ha az összes európai *I. vespertilionis* mintát vesszük figyelembe, a Spanyolországban gyűjtöttek jelentősen különböztek (és filogenetikailag is külön helyezkedtek el) más vizsgált haplotípusoktól. E jelenség legvalószínűbb háttértényezője az lehet, hogy e kullancsfaj denevér gazdái az Ibériai-félszigeten izolált populációkat képviselnek, amelyeknek a tőlük északabbra lévőekkel való genetikai keveredését a Pireneusok – a génáramlás földrajzi választóvonalaként – megakadályozzák (Dool és mtsai, 2013). Ugyanezt tükrözi a spanyol és a KKE-i *R. hipposideros* törzsfán elfoglalt helyzete (4.8.1.1.b ábra). A spanyol és KKE-i *I. vespertilionis* haplotípusok COI szekvencia eltéréseinek szintje (5,4%) megközelítette a kullancsfajok között átlagosan meglévő genetikai eltérés szintjét (6,1%: Lv és mtsai,

hogy megmaradjon a genetikai diverzitás a denevérgazdáiban éppúgy (Flanders és mtsai, 2009), mint *I. vespertilionis* fajú kullancsaikban (ahogy vizsgálatunk eredményei mutatják).

Vizsgálatunk eredményei első alkalommal igazolták, hogy Ázsiában is élnek olyan denevérek, amelyek genetikailag és morfológiailag is az *I. ariadnae* fajhoz állnak legközelebb (ezt eddig csak Európából ismertük). Az *I. ariadnae* legfontosabb gazdája a *Myotis*-fajok (4.5.2. fejezet), és jelen tanulmányunk egyik *I. ariadnae*-szerű példányát is *Myotis*-fajról gyűjtötték Vietnámban. A Murininae alcsalád képviselői, amelybe a *Murina leucogaster* (a Japánban gyűjtött, *I. ariadnae* fajhoz közel álló kullancs gazdája) is tartozik, szintén a *Myotis*-fajok rokonai (Ruedi és mtsai, 2013). Ez a genetikai vonal (amelybe az *I. ariadnae* és a hasonló haplotípusok gazdája tartoznak) egyértelműen külön helyeződik a denevérfajok törzsfáján (4.8.1.1.b ábra).

Az *I. simplex* kullancsfaj specifikus gazdája, a *Miniopterus schreibersii* denevérfaj rendszertanát nemrég átdolgozták. Míg korábban az a nézet uralkodott, hogy az Óvilágban széles körben elterjedt egységes fajról van szó, kiderült róla, hogy valójában több fajból álló fajkomplex (Li és mtsai, 2015). E fajkomplexből vizsgálatunk során az *I. simplex* kullancsfajt mind *Mi. magnater* (India), mind pedig *Mi. fuliginosus* fajról (Japán) gyűjtöttük, ami lehetővé tette, hogy ezeket az Európában *Mi. schreibersii* denevérfajról gyűjtött példányokkal filogenetikailag összevessük. A törzsfán nemcsak a négy *I. simplex* haplotípus alkotott a többi denevérkullancstól külön csoportot (4.8.1.1.a ábra), de a három fajba tartozó denevérgazdáik is elkülönültek a vizsgálatunkban szereplő más denevérfajoktól (4.8.1.1.b ábra). Ismételten, az eljegesedés és az eredményezett földrajzi izoláció tekinthető a legfőbb mechanizmusoknak e közeli rokonságban álló, ázsiai *Miniopterus*-fajok genetikai differenciálódásában (Li és mtsai, 2015), és ugyanez szolgálhatott a vizsgálatunkban denevérkullancsok között megfigyelt relatív genetikai heterogenitás (mindössze 96% COI szekvencia azonosság) alapjául is.

A szakirodalomban felvetődött, hogy az exofil, generalista kullancsfajok esetében, mint az *I. persulcatus* (amely hasonlóan nagy kiterjedésű, észak-eurázsiai térségben fordul elő) a jegesedést kísérő események bármiféle jelentős genetikai sokféleség elmosódásához vezethettek, még pedig a refúgiumok kialakulásával beköszöntő genetikai keveredés következtében (Kovalev és Mukhacheva, 2012). Épp ellenkezőleg, a specialista denevérek kullancsok és gazdáik populációit Ázsia déli részein genetikai értelemben valószínűleg kevésbé egységesíthették a jégkorszakok, és fennmaradhatott a fajok korábban megkezdődött elkülönülésének tendenciája. Délkelet-Ázsia ugyanis a jégkorszakok során Eurázsia más részeitől elválasztva, földrajzi izolációban volt, így ott a biodiverzitás nemcsak hogy fennmaradhatott, de még gazdagodhatott is a jégkorszak(ok) alkalmával (Woodruff, 2010).

Következtetésképpen, valamennyi fejlődési stádium morfológiai vizsgálata és egy nagyobb mintahalmazból végzett genotipizálás tisztázhatja a denevérekhez társult kullancsok itt először kimutatott nagyon eltérő változatainak pontos taxonómiai státuszát. Ez pótolhatná egyes – vizsgálatunkban azonosított vagy korábban leírt – délkelet-ázsiai denevérek kullancs genotípusok bizonyító erejű (*voucher*) példányának hiányát. Tanulmányunk adatai azt is tükrözik, hogy az *I. vespertilionis* valószínűleg fajkomplext alkot, figyelembe véve azt a nagy támogatottságot is, amely a japán és vietnámi eredetű két példányt kizárta az összes európai mintát magában foglaló filogenetikai csoportból.

4.8.2. A denevérovantag (*Argas vespertilionis*) genetikai heterogenitása az Óvilágban

Előzmények

Az Argasidae család rendszertana ellentmondásos, mivel az óvantagok többsége több genusba is besorolható (Burger és mtsai, 2014). Ennek megfelelően az óvilági denevérovantag (*Argas vespertilionis*) taxonómiai státusza is bizonytalan, mert eredetileg a *Carios* nem típusfaja volt (Hoogstraal, 1958), de a valid óvantag- és kullancsnevek legutóbbi listájában az *Argas* nem tagjaként szerepel (Guglielmone és mtsai, 2010). A legújabb filogenetikai vizsgálatok sem amellett szólnak, hogy az óvilági denevérovantag az *Argas* genus képviselője lenne, mivel e fajt tévesen helyezték az Argasinae alcsaládba (Klompen és Oliver, 1993), és 12S rRNS génje alapján az Ornithodorinae alcsaládba kellene tartoznia (Burger és mtsai, 2014). Ezen túlmenően az *A. vespertilionis* fajszerű egységét régóta megkérdőjelezték (Hoogstraal, 1958).

Nemrég eurázsiai denevérekullancsok fajon belüli, nagyfokú mitochondrialis marker heterogenitását mutattuk ki (4.8.1. fejezet). Újabb vizsgálatunk célja az volt, hogy összehasonlítsuk az *A. vespertilionis* óvantagfajt is hasonló összefüggésben, tehát morfológiáját, mitochondrialis genetikai markereit és gazdaspektrumát az Óvilágban.

4.8.2.1. táblázat. A felmérésben szereplő denevérovantagok gyűjtési adatai és *cox1* ill. 16S rRNS gén szekvenciáinak hozzáférési számai. Rövidítések: At - *Argas transgariëpinus*; Osp. - *Ornithodoros*-faj

Faj	Stádium (n=)	Gazdafaj	Ország (hely)	Génbanki szám: COI, 16S
<i>Argas vespertilionis</i>	lárva (58×)	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	Magyaró. (Mezőföld)	KX431953, KX831484
	lárva (5×)	<i>Myotis alcathoe</i>	Magyaró. (Bakony)	KX431955, KX831486
	lárva (12×)	<i>Eptesicus serotinus</i>	Magyaró. (Béda)	-
	lárva (15×)	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	Magyaró. (Dráva)	-
	lárva (1×)	<i>Pipistrellus kuhlii</i>		-
	lárva (27×)	<i>Plecotus austriacus</i>		KX431954, KX831485
	lárva (6×)	<i>Myotis dasycneme</i>	Magyaró. (Gemenc)	-
	lárva (58×)	<i>Pipistrellus nathusii</i>		-
	lárva (10×)	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>		-
	lárva (1×)	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Magyaró. (Kecső)	KX431954, KX831489
	lárva (2×)	<i>Eptesicus serotinus</i>	Magyaró. (Mecsek)	-
	lárva (1×)	<i>Myotis acathoe</i>		-
	lárva (18×)	<i>Myotis brandtii</i>		-
	lárva (27×)	<i>Myotis dasycneme</i>		-
	lárva (4×)	<i>Nyctalus noctula</i>		-
	lárva (1×)	<i>Plecotus auritus</i>		-
	lárva (5×)	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>		-
	lárva (1×)	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>		-
	lárva (19×)	<i>Vespertilio murinus</i>	Magyaró. (Miskolc)	-
	lárva (1×)	<i>Myotis alcathoe</i>	Magyaró. (Nagyvisnyó)	-
	lárva (1×)	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>		-
	lárva (1×)	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Magyaró. (Noszvaj)	-
	lárva (1×)	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Magyaró. (Ócsa)	KX431953, KX831488
	lárva (2×)	<i>Vespertilio murinus</i>	Magyaró. (Sopron)	KX431953, KX831487
	lárva (2×)	<i>Eptesicus serotinus</i>	Románia (Somova)	KX431954, KX831490
	lárva (9×)	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Románia (Salciua)	-
	lárva (6×)	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Olaszó. (Bergamo)	KX431953-4, KX831496-8
	lárva (7×)	<i>Pipistrellus javanicus</i>	Vietnám (Can Gio)	KX431957, KX831492
	lárva (3×)	<i>Pipistrellus abramus</i>	Vietnám (Thanh Hoa)	KX431958, KX831493
	lárva (9×)	<i>Pipistrellus abramus</i>	Vietnám (Bach Long Vi)	KX431959-60, KX831494-5
lárva (1×)	<i>Pipistrellus rueppellii</i>	Kenya (South Horr)	KX431956, KX831491	
At	lárva (1×)	<i>Pipistrellus hesperidus</i>	Dél-Africa	KX431961, -
Osp	lárva (3×)	<i>Balantiopteryx plicata</i>	Mexikó (Chiapas)	KX431962, KX831499

Molekuláris módszerek: A, B

Eredmények

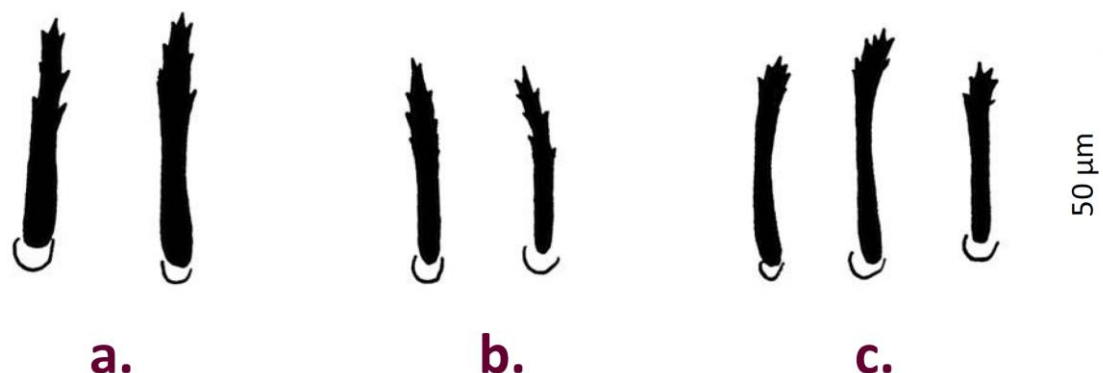
Összesen 318 óvantaglárvét gyűjtöttünk 17 denevérfajról (amelyek hat nembe tartoztak) hét országban. Négy kivételével mindet *A. vespertilionis* fajként azonosítottuk (4.8.2.1. táblázat). Az *A. vespertilionis* lárvák többségét (59,1%: 318-ból 188, CI: 53,5–64,6%) *Pipistrellus*-fajokon találtuk. A *Myotis alcaethoe* új gazdafaja az óvilági denevérovantagnak.

Egy lárvét Dél-Afrikából *A. transgaripepinus* fajba tartozóként határoztunk meg (a test szőrei, a tapogató ízek, csípők és az I. tarsus alapján). Három lárva Mexikóból az *Ornithodoros* nemet képviselte (a megnyúlt, körte alakú hátlemez alapján, amelynek szélei nem voltak párhuzamosak), de a hypostoma hiányában nem tudtuk faji szinten azonosítani.

Néhány diagnosztikai fontosságú képlet mérési eredményei nem különböztek jelentősen az európai és vietnámi *A. vespertilionis* lárvák között (nem közölt adatok), kivéve a hátlemez hosszát és szélességét (az olasz/román vs. vietnámi minták hátlemez hosszúsága: $t = 3,49$, $df = 13$, $P = 0,004$; az olasz/román vs. vietnámi minták hátlemez szélessége: $t = 3,21$, $df = 13$, $P = 0,006$). A hátlemez alak indexe (hossz/szélesség aránya), a hypostoma alakja és fogazata (4/4 elöl, 2/2 a csúcstól hátrébb) nem különbözött szignifikánsan e két kategória között. A sternalis és analis szőrök következetesen (gyűjtési helytől függetlenül) hegyesek, tűszerűek voltak, míg a dorsalis szőrök fűrészesek. A fűrészkes szőrök felépítése kis eltérést mutatott a földrajzilag távoli minták között: az európai denevérovantag lárvák szőreinek felső felében elkülönült felületi nyúlványok vannak, de a vietnámiak szőreinek vége pamacszerűen (csoportos nyúlványokra) töredezett (4.8.2.1. ábra).

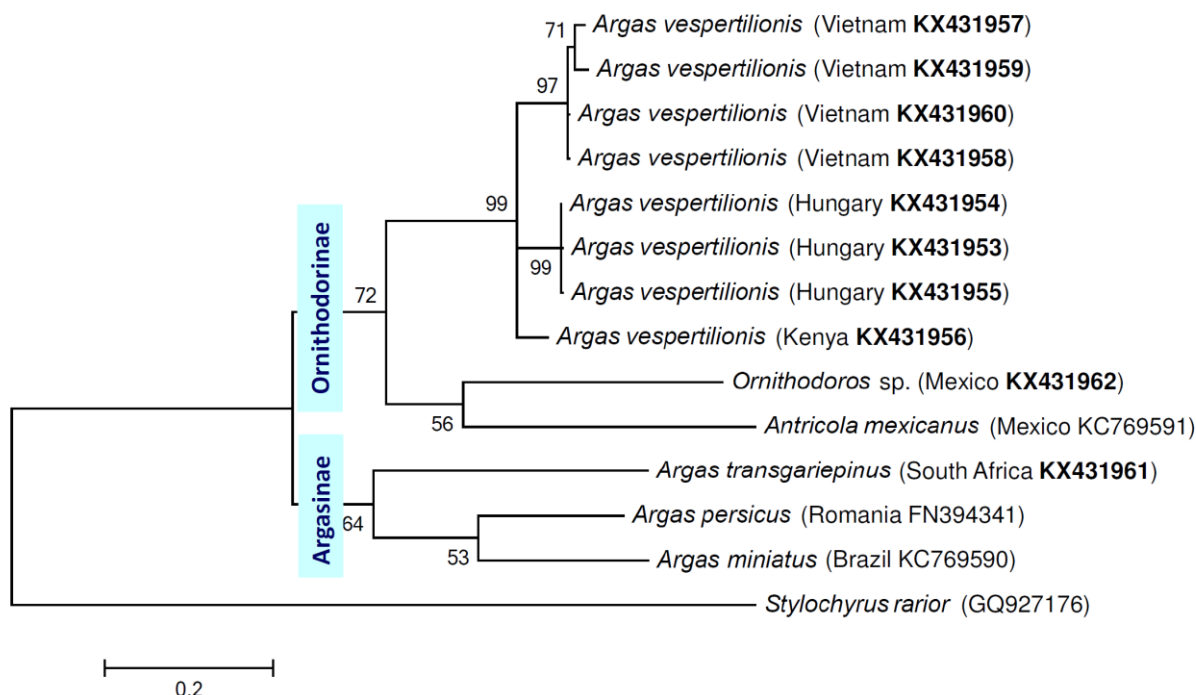
A *cox1* génszakasz szekvenálása 17 mintánál volt eredményes (4.8.2.1. táblázat; 4.8.2.2. ábra). Az *A. vespertilionis* *cox1* szekvenciák 0-2 nukleotid (0-0,3%) különbséget (650-652/652 bp = 99,7-100% azonosságot) mutattak Magyarországon, Romániában és Olaszországban. Ugyanakkor az európai haplotípusok 37-38 nukleotidban (5,7-5,8%) különböztek egy Kenyában gyűjtött *A. vespertilionis* lárvétól, ami ez utóbbival 94,2-94,3% (614-615/652 bp) azonosságnak felel meg. Ennél is kifejezettebb volt a szekvenenciaeltérés az európai és vietnámi denevérovantagok között, tehát 46-49 nukleotid (7,1-7,5%) különbség, vagyis csak 92,5-92,9% (603-606/652 bp) azonosság.

A *cox1* szekvenciák különbsége a vietnámi *A. vespertilionis* minták között 2-15 nukleotid volt (0,3-2,3%), ami 97,7-99,7% (637-650/652 bp) azonosságot jelent, tehát a minták Vietnámon belül heterogénebbek voltak, mint Európa három országa között. A *cox1* törzsfa topológiája is ugyanezeket a különbségeket tükrözte (az *A. vespertilionis* haplotípusok elkülönülése Vietnámon belül és Magyarország-Vietnám között magas támogatottságot kapott). Az *A. vespertilionis* izolátumoknak az Ornithodorinae alcsalád két képviselőjével való csoportosulása mérsékelt (72%) támogatottságú volt (4.8.2.2. ábra).



4.8.2.1. ábra. A fűrészkes szőrök felépítése a romániai (a), olaszországi (b) és vietnámi (c) *Argas vespertilionis* lárvák esetében

4.8.2.2. ábra. Az *Argas vespertilionis* *cox1* génre épülő törzsfája. Vizsgálatunk mintáinak génbanki száma vastagon kiemelt. Az olaszországi és romániai minták megegyeztek a magyarral, így külön nem szerepelnek.

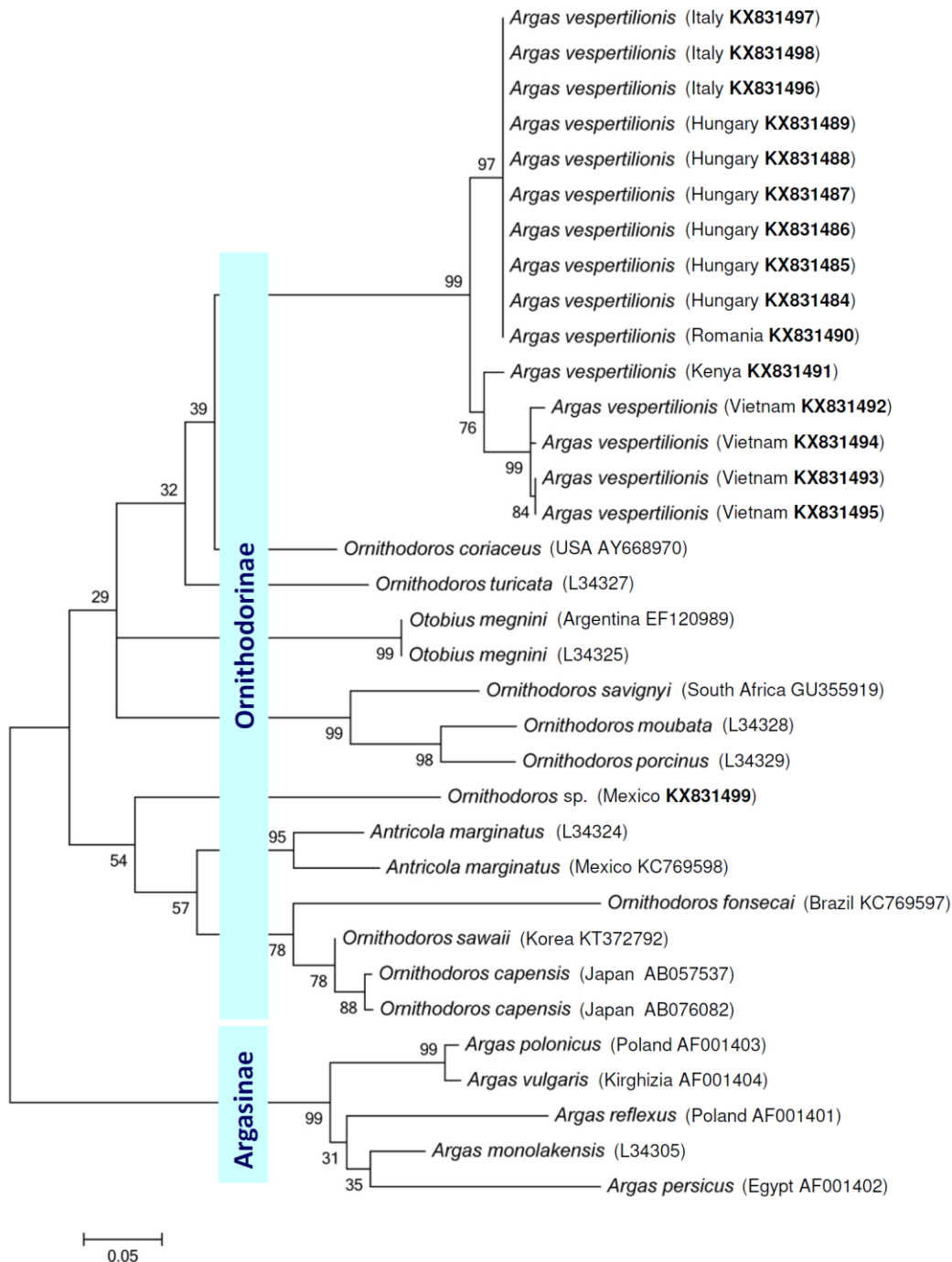


A 16S rRNS gént 16 mintából szekvenáltuk. A denevéróvanyag legfeljebb négy nukleotidban (0,9%) különbözött (437/441 bp = 99,1% azonosság) az európai haplotípusok között, míg ezek 20 nukleotid (4,5%) eltérést mutattak a Kenyában gyűjtött *A. vespertilionis* lárvától (420/440 bp = 95,5% azonosság), és 25 nukleotid (5,7%) különbséget (416/441 bp = 94,3% azonosság) a vietnámi *A. vespertilionis* lárvától. Ez utóbbiak között a 16S rRNS szekvenciák akár hat nukleotidban (1,4%) is különböztek, ami 98,6% (436/442 bp) azonosságnak felel meg. A 16S rRNS gén törzsfája alapján (4.8.2.3. ábra) az európai *A. vespertilionis* elkülönülése a kenyaitól és vietnámitól magas támogatottságot (99%) kapott, és e faj az Argasinae alcsaládon kívül helyeződött; ugyanakkor az Ornithodorinae alcsaládon belüli viszonyai gyenge támogatottságúak voltak (4.8.2.3. ábra).

Megbeszélés

Munkánk során 314 *A. vespertilionis* lárvát gyűjtöttünk és vizsgáltunk morfológiailag, illetve genetikailag. Az, hogy csak lárvát találtunk e fajból, jól magyarázható életciklusával: az *A. vespertilionis* lárvái hetekig is szívhatnak vért denevér gazdáikból (14-31 napig) a nymphákkal, adultokkal szemben (ezek egy óránál kevesebb ideig: Hoogstraal, 1956), ezért denevérekről szinte kizárólag csak lárvák gyűjthetők. Vizsgálatunkban az *A. vespertilionis* példányait 15 denevérfajról gyűjtöttük, amelyek legtöbbje már ismert gazdája ennek az élősködőnek (így négy *Pipistrellus*-faj, hét *Myotis*-faj, két *Eptesicus*- és két *Nyctalus*-faj: Siuda és mtsai, 2009; Frank és mtsai, 2015).

Noha az *A. vespertilionis* a valid óvanyag- és kullancsnevek legutóbbi listájában az *Argas* nem tagjaként szerepel (Guglielmone és mtsai, 2010), morfológiai és filogenetikai vizsgálatai ezt cáfolják (Burger és mtsai, 2014; Klompen és Oliver, 1993). Ehelyett – 12S rRNS génje alapján – igazolták, hogy az *A. vespertilionis* az Ornithodorinae alcsaládba tartozik (Burger és mtsai, 2014). Filogenetikai vizsgálatunk eredményei is azt tükrözték, hogy a törzsfán az *A. vespertilionis* haplotípusai az Argasinae alcsaládon kívül helyezkednek el.



4.8.2.3. ábra. Az *Argas vespertilionis* 16S rRNS gén törzsfája (vastag génbanki szám: saját minták).

Az elmúlt évtizedekben megvitatták, hogy mely morfológiai bélyegek lehetnek alkalmasak az Argasidae családon belüli taxonómiai bizonytalanság feloldására. A lárva stádiumban az anatómiai részeknek megfelelő szőrszálak számát ajánlott figyelembe venni a genus meghatározásához (Barros-Battesti és mtsai, 2013), az egymáshoz közel álló fajok megkülönböztetésében pedig a hátlemez alakja és paraméterei, a hypostoma felépítése és a szőrök hossza fontos (Jones és Clifford, 1972; Venzal és mtsai, 2013).

Annak lehetőségét, hogy az *A. vespertilionis* név alatt több faj is létezhet, már Hoogstraal is felvetette (Hoogstraal, 1958), de ezt – főként molekuláris alapon – eddig nem vizsgálták. Tanulmányunkban a vonatkozó paraméterek túlnyomó többsége nem különbözött jelentősen az európai és a

vietnámi *A. vespertilionis* lárvák között, noha ezek két mitochondrialis genetikai marker alapján jól elkülönültek. Hasonlóképpen, egy neotrópusi denevérvantagokat összehasonlító közleményben egyes paraméterek (például bizonyos szőrök hossza) csak kis mértékben különbözött a más-más országokból származó példányok között, és ezeket azonos fajúaknak tekintették (Venzal és mtsai, 2013). Az *A. vespertilionis* fajon belüli alak (körvonal) változatosságát is leírták (Hoogstraal, 1958). Továbbá annak ellenére, hogy eltérést találtunk a hátlemez átlagos hosszában és szélességében az európai és a vietnámi minták között, ez önmagában kevés lenne új fajok megkülönböztetéséhez, mert a hátlemez alakja (amit a hasonló hossz/szélesség arány mutatott) ebben az összefüggésben mérvadóbb (Jones és Clifford, 1972; Venzal és mtsai, 2013). Másrészt kis különbséget a fűrészkes végű szőrök között is megfigyeltünk az Eurázsia távoli régióiban gyűjtött *A. vespertilionis* lárvák esetében. Azonban, míg a szőrök típusa valóban különbözik az egymáshoz rendszertanilag közel álló *Ornithodoros*-fajok lárvái között (Jones és Clifford, 1972), ezek egyéb tulajdonságaikban (szőrhossz, hypostoma) is eltértek, szemben az általunk vizsgált *A. vespertilionis* lárvákkal. Ezért, további megkülönböztető bélyegek hiányában jelen eredményeink arra utalnak, hogy az európai és a vietnámi (genetikailag legjobban különböző) *A. vespertilionis* lárvák ugyanahhoz a fajhoz tartoznak, és a megfigyelt kisebb különbségek a populációk közötti, fajon belüli változatosságként értelmezhetőek. Az általunk elemzett példányok morfológiai alapon a Japánból leírt *A. vespertilionis* lárvákkal is egyazon fajba tartozhatnak (Yamaguti és mtsai, 1971).

Másfelől, az európai és a vietnámi minták *cox1* szekvencia eltérése (7,1-7,5%) meghaladta a kullancsfajok között megállapított átlagos eltérés szintjét (6,1%: Lv és mtsai, 2014). Eszerint morfológiailag hasonló, de genetikailag eltérő *A. vespertilionis* populációk léteznek Európában és Délkelet-Ázsiában, ami arra utal, hogy ezt az óvantagfajt legalább két feltételezhető kriptikus faj komplexének (vagy alfajok csoportjának) kellene tekinteni. Ez indokoltnak tűnik pusztán a lárva stádium felépítése alapján is (elvégre lárvák morfológiai különbségei alapján írtak le több új óvantagfajt: például Jones és Clifford, 1972), de e következtetés végső megerősítése mindkét térségből származó kifejlett egyedek morfometriai és több nukleáris markerre (18S és 28S rRNS génre) épülő molekuláris biológiai vizsgálatától remélhető. Ugyanebben az összefüggésben, a kenyai és az európai *A. vespertilionis* közötti szekvencia eltérés elmaradt az európai és vietnámi közöttitől, ami arra utalhat, hogy a folyamatban lévő génkicserélődés (vagy korábbi genetikai kapcsolat) valószínűbb ebben az irányban (noha nagyobb mintaszámra lesz szükség a szubszaharai Afrikából, hogy e tekintetben végső következtetésre juthassunk). E lehetőség mellett szól, hogy az *A. vespertilionis* néhány, vizsgálatunkban is szereplő gazdafaja, legfőképp a *Pipistrellus nathusii* ismert hosszú távú vonulásáról (amely akár 1900 km is lehet) északkelet-délnyugati irányban (Hutterer és mtsai, 2005). Egy másik fontos gazdafaj, a *P. kuhlii* széles körben elterjedt Európától a Közel-Keleten át egészen Észak-Afrikáig és Ázsiáig (Bray és mtsai, 2013).

Eurázsiaiban eddig azonos fajúnak tartott denevérkullancsok között fedeztünk fel nagyfokú mitochondrialis marker heterogenitást, vagyis a faji határt messze meghaladó, akár 16%-os *cox1* szekvencia eltérést (4.8.1. fejezet). Ez az egyes kullancsfajok genus-szintű gazda-fajlagosságával magyarázható, illetve a szóban forgó denevérfajok földrajzi izolációjával (4.8.1. fejezet). A denevérkullancsokhoz képest – mint itt rámutattunk – az *A. vespertilionis* földrajzilag távoli példányai között megfigyelt morfológiai és genetikai különbség kevésbé kifejezett, aminek egyik fontos háttér tényezője ennek az óvantagfajnak a széles gazdaspektruma (tehát a Vespertilionidae családba tartozó denevérek legalább hat genera, ahogy ez jelen felmérésünkéből is kitűnt), ami megakadályozza populációinak teljes allopatrikus izolációját.

Következtetésképpen, itt vizsgált elterjedési körén belül a lárvák fenotípusa nem támasztja alá, hogy az *A. vespertilionis* név alatt több faj is létezne. Két mitochondrialis genetikai markerre alapozott filogenetikai vizsgálata viszont amellettt szól, hogy legalább két feltételezhető kriptikus faj (vagy alfaj) komplexe. Részben az *A. vespertilionis* széles gazdaspektruma magyarázhatja, hogy mitochondrialis genetikai heterogenitása messze elmarad az Eurázsia ugyanezen földrajzi régióiból vizsgált kullancsokétól.

4.8.3. A denevéróvantag (*Argas vespertilionis*) és a *Babesia vesperuginis* genetikai hasonlósága Közép-Európa és Közép-Ázsia között

Előzmények

A vérszívó ízeltlábúak által közvetített egysejtű élősködők több csoportjából is fordulhatnak elő fajok denevérek vérében, többek között trypanosomák és piroplasmák (Gardner és mtsai, 1987). Az utóbbi csoportból egyedül a *Babesia vesperuginis* fajról ismert, hogy denevéreket fertőz, és azokban kórtani hatást fejt ki (Gardner és Molyneux, 1987). Ez utóbbi kapcsán vetődött fel, hogy talán a denevéróvantag (*Argas vespertilionis*) e piroplasma vektora, mert külső élősködőként kizárólag ennek lárváit találták meg a babesia-fertőzött denevéreken.

A *B. vesperuginis* fajt nemrég Közép-Európában is azonosítottuk (4.5.2. fejezet), és nagy számban gyűjtött *A. vespertilionis* lárvát vizsgáltunk meg filogeográfiai összefüggésben Európa három országát, Délkelet-Ázsiát (Vietnám) és Kelet-Afrikát (Kenya) beleértve (4.8.2. fejezet). Egy újabb felmérésünk célja az volt, hogy e két korábbi eredményeit kiegészítsük, és megvizsgáljuk, hogy (a) a Kína közép-ázsiai részéből származó *A. vespertilionis* lárvák genetikai markerei (cox1 és 16S rRNS gén) alapján milyen filogenetikai viszonyban állnak az Eurázsia más térségeiből származókkal, illetve hogy (b) a *B. vesperuginis* előfordul-e Ázsiában, és ha igen, van-e különbség Közép-Európa és Közép-Ázsia mintái között e piroplasma legfontosabb genetikai markerében (18S rRNS).

Molekuláris módszerek: A, B, K

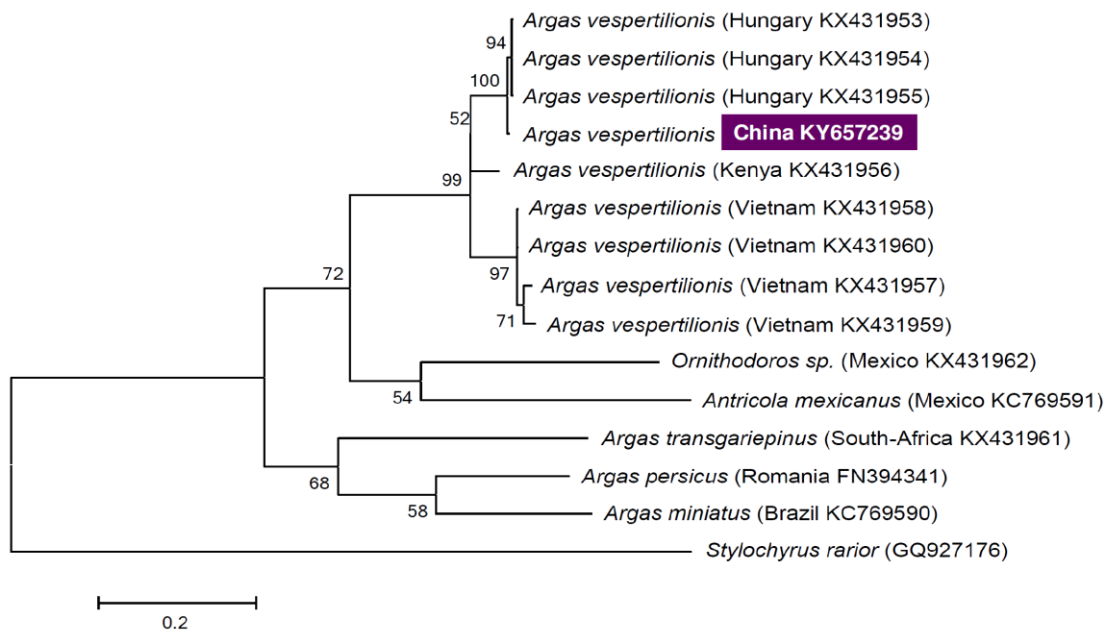
4.8.3.1. táblázat. A vizsgálatunkban használt *Argas vespertilionis* lárvák származási országa, gazdafaja (Chiroptera: Vespertilionidae) és mintaszáma.

Ország (hely ill. számuk)	Gazdafaj (egyedszám)	Lárvák száma	DNS minták száma
Magyarország (13)	<i>Pi. pipistrellus/pygmaeus/nathusii/kuhlii</i> (6/14/1/1)	152	81
	<i>Myotis alcaethoe/dasychneme/brandtii</i> (4/5/1)	60	32
	<i>Plecotus auritus/austriacus</i> (1/4)	28	18
	<i>Nyctalus noctula</i> (2)	4	3
	<i>Eptesicus serotinus</i> (2)	14	9
	<i>Vespertilio murinus</i> (2)	21	12
Románia (2)	<i>Pipistrellus pipistrellus</i> (5)	9	6
	<i>Eptesicus serotinus</i> (1)	2	1
Olaszország (1)	<i>Pipistrellus pipistrellus</i> (1)	3	3
Kenya (1)	<i>Pipistrellus cf. rueppellii</i> (1)	1	1
Vietnám (3)	<i>Pipistrellus javanicus/cf. abramus</i> (1/2)	16	16
Kína (Xinjiang)	<i>Vespertilio sinensis</i> (2)	11	11

Eredmények

Piroplasma DNS az *Argas vespertilionis* fajban

A piroplasmák 18S rRNS génszakaszának kimutatására épülő PCR-ben 12 minta bizonyult pozitívnak: tíz Magyarországról és kettő Kínából. Hazánkban a PCR pozitív *A. vespertilionis* lárvák három helyről származtak, három denevérről, amelyek a következő fajokba tartoztak: (1) *Eptesicus serotinus* (amelyről 12 lárvát gyűjtöttünk: három *pool*-minta egyenként két lárvával és két egyedi minta is pozitív volt, ami 42-67% prevalenciának felel meg erről a gazdáról); (2) *Plecotus austriacus* (amelyről hat lárvát gyűjtöttünk: két *pool*-minta egyenként két lárvával és két egyedi minta is pozitív volt, ami 67-100% prevalenciának felel meg erről a gazdáról); és (3) *Pipistrellus pipistrellus* (amelyről egy lárvát gyűjtöttünk, és az pozitív volt). Kínából két *A. vespertilionis* egyed (*Vespertilio murinus* denevérfaj két egyedéről gyűjtve) tartalmazott piroplasma DNS-t. Mind a 12 PCR pozitív minta szekvenálása *B. vesperuginis* fajt azonosított, 100% (448/448 bp) azonossággal a magyar és a kínai minták között.



4.8.3.1. ábra. A kínai *A. vespertilionis* elhelyezkedése az óvantagok *cox1* gén t örzsáján.

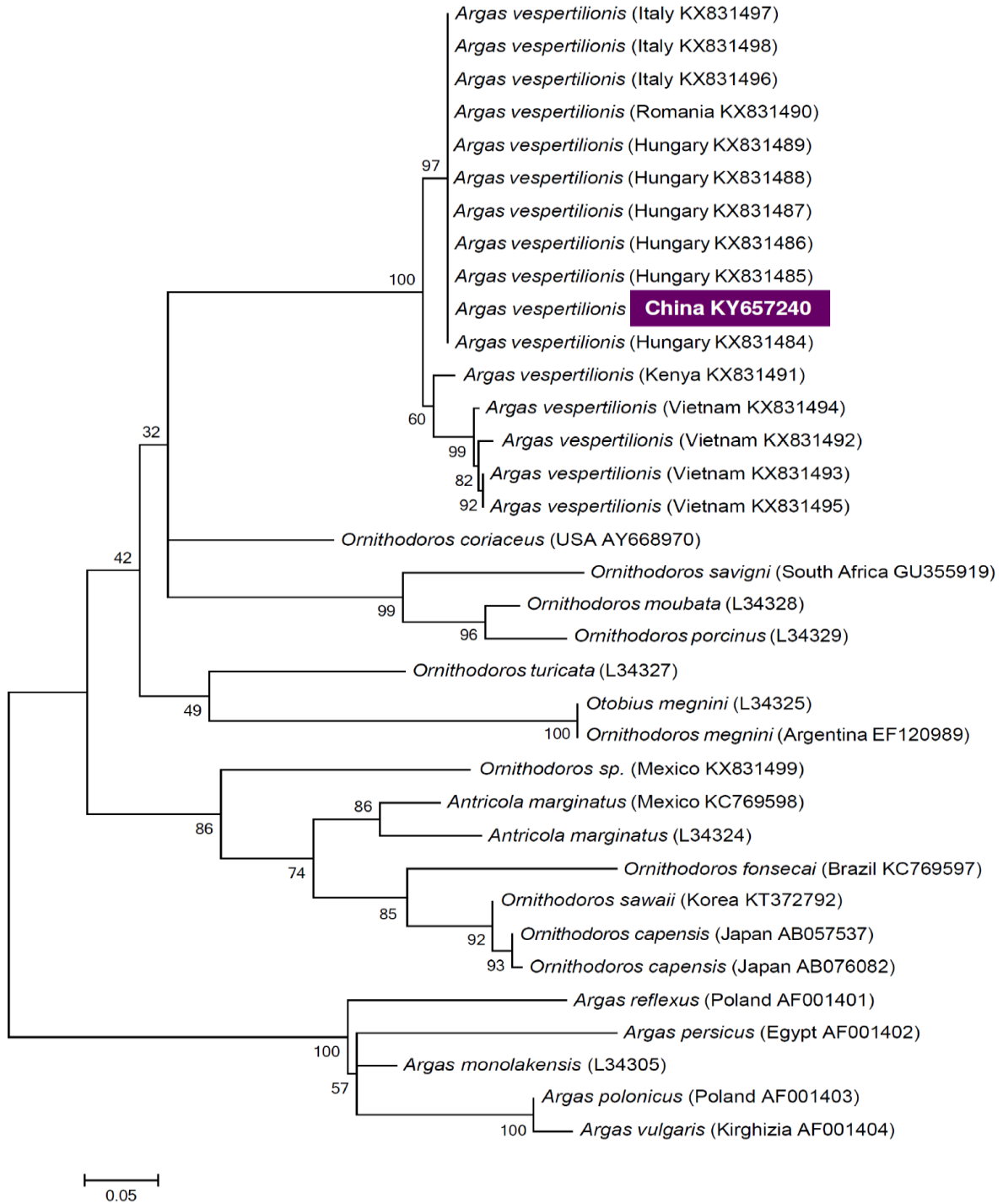
Az Északkelet-Kínából származó *A. vespertilionis* mitochondrialis markereinek vizsgálata

Az *A. vespertilionis* *cox1* szekvenciák öt-hat nukleotid (0,8-0,9%) eltérést mutattak, tehát 99,1-99,2%-ban (646-647/652 bp) voltak azonosak Magyarország és Kína (Xinjiang) között. Másfelől viszont a kínai haplotípusok 45-48 nukleotidban (6,9-7,4%) különböztek a vietnámiaktól, ami mindössze 92,6-93,1% (604-607/652 bp) azonosságnak felel meg. A *cox1* törzsfa (4.8.3.1. ábra) ugyanezeket a viszonyokat tükrözte: a Magyarországról és Kínából származó *A. vespertilionis* együtt csoportosult, de – 99% támogatottság mellett – külön a Vietnámban gyűjtöttektől.

Az *A. vespertilionis* 16S rRNS szekvenciák legfeljebb két nukleotid (0,5%) eltérést (438-440/440 bp = 99,5-100% azonosság) mutattak a magyar és kínai haplotípusok között, míg ezek 23-24 nukleotidban (5,2-5,4%-ban) különböztek (tehát csak 418/441-442 bp = 94,6-94,8%-ban voltak azonosak) a vietnámiakkal. A 16S rRNS törzsfa (4.8.3.2. ábra) a kínai *A. vespertilionis* ahhoz a csoporthoz tartozott, amelyet az európai minták alkottak, miközben a kínai és vietnámi minták elkülönülése erős (100%) támogatottságot kapott.

Megbeszélés

Legjobb tudomásunk szerint ez az első molekuláris bizonyítéka annak, hogy a *B. vesperuginis* Ázsiában előfordul. Korábbi vizsgálatunkban kullancsokat gyűjtöttünk három családba tartozó denevérekről, amelyek közül a *B. vesperuginis* DNS csak a Vespertilionidae család fajairól származó kullancsokban (*I. vespertilionis*, *I. ariadnae*) volt kimutatható, míg más (kérődzőket és kutyát fertőző) piroplasmák DNS-ét a Rhinolophidae és a Miniopteridae családok denevérfajairól gyűjtött kullancsok (*I. vespertilionis* és *I. simplex*) hordozták (4.5.2. fejezet). Ez a korábbi megfigyelés jól egyezik ennek a vizsgálatnak az eredményeivel, mivel (1) egészen mostanáig, a Rhinolophidae és Miniopteridae családok denevérfajainak kiterjedt hazai vizsgálata ellenére az *A. vespertilionis* óvantagfajt csak a Vespertilionidae család tagjain találtuk meg (4.8.3.1. táblázat), továbbá (2) itt ez utóbbiakról gyűjtött *A. vespertilionis* lárvák nagyszámú mintájában csak a *B. vesperuginis* DNS-ét azonosítottuk. E jelenség legvalószínűbb magyarázata (ha elfogadjuk: a *B. vesperuginis* legvalószínűbb vektora az *A. vespertilionis*), hogy a vespertilionid denevérek a *B. vesperuginis* fajhoz annak feltételezhető óvantag biológiai vektorából jutnak, míg a Rhinolophidae/Miniopteridae fajok a piroplasmák szélesebb köréhez vagy legalábbis DNS-éhez juthatnak hozzá leginkább mechanikai vektorokat tartalmazó táplálékukból (4.5.2. fejezet).



4.8.3.2. ábra. A kínai *A. vespertilionis* elhelyezkedése az óvantagok 16S rRNS gén törzsfáján.

Korábbi eredményeink (4.5.2. fejezet) alapján a *B. vesperuginis* 18S rRNS génszakasz szekvenciái Európán belül egyezést mutattak, tehát Magyarország, Románia (GénBank: KU958544) és Anglia (AJ871610) között. Az itt elvégzett szekvencia összehasonlítások alapján e piroplasma 18S rRNS génje jóval nagyobb földrajzi távolságban is konzervatívnak tűnik (figyelembe véve, hogy Magyarország, tehát Közép-Európa és Xinjiang, Közép-Ázsia között mintegy 5000 km van). Ezzel szemben más *Babesia*-fajok esetében országon belül is lehet 18S rRNS szekvencia eltérés, így például a *B. canis* két eltérő 18S rRNS genotípusa megtalálható Magyarországon és Románián belül is (GénBank: KP835549-50, illetve KU958551-2) (4.5.2-3. fejezet).

Az Észak-Palearktikum denevérfaunája két többé-kevésbé izolált faj együttesből áll, az európai-uráliból és a szibériai távol-keletiből (Orlova, 2014). Mint arra a szakirodalomban már utaltak, hasonló térbeli eloszlási mintázat figyelhető meg a szóban forgó észak-eurázsiai denevérek ektoparazitái körében, és a két térségben (faunisztikai komplexben) egyaránt előforduló denevérfajok ektoparazitáinak vizsgálata segíthet felderíteni az európai és a szibériai részek közötti kapcsolat lehetőségét (Orlova, 2014). E koncepció vizsgálatait során figyelembe kell venni, hogy Európa jégkorszak(ok) utáni újra benépesülése több *Myotis*-faj esetében (köztük az *A. vespertilionis* fontos gazdáival, amilyen a *My. alcaethoe* és a *My. brandtii*) kelet felől történt, a Kaukázus térségéből (Dietz és Kiefer, 2016). Földtörténeti értelemben ez is hozzájárulhatott a denevérovantagok és óvantag közvetítette kórokozók itt kimutatott genetikai homogenitásához Közép Európa és Közép Ázsia között. Egészen a napjainkhoz közeli időszakig, a Nyugat-Szibériai Síkság barrierként szolgált (kettéválasztva az Észak-Palearktikum denevérfaunáját), de az elmúlt évtizedekben az ember megtelepedett ebben a térségben és a nem vándorló denevérfajok így növekvő számban jutottak emberközeli menedékhez, ami kedvezett a denevérek Kelet- és Nyugat-Palearktikum közötti terjedésének (Orlova, 2014). Egyes denevérfajok, amelyek középtávon vándorolnak (köztük a *B. vesperuginis* fontos gazdái, így a *My. daubentonii*), az egész Észak-Palearktikumban előfordulnak Európától a Távol-Keletig (Bogdanowicz, 1994; Dietz és Kiefer, 2016). Ráadásul, léteznek hosszú távon vándorló (transpalearktikus) fajok, amelyek át is juthatnak ezen a nagy térségen, amilyen például a *My. dasycneme*, a *V. murinus* és az *E. nilssonii* (Orlova, 2014) – és ezek közül az első kettő az *A. vespertilionis* fontos gazdája (4.8.2. fejezet). De még a denevérovantagok talán legkiemelkedőbb gazdafaja, a *Pi. pipistrelli* is előfordul Közép Európában éppúgy, mint közép-Ázsiában, és noha általában nem vándorol, alkalmanként nagyobb távolságot is megtehet (Hutterer és mtsai, 2005).

A *Vespertilio murinus*, amely denevérfaj vizsgálatunk során Közép-Európában és Északkelet-Kínában genetikailag rokon *A. vespertilionis* lárvákat hordozott, széles körben elterjedt a Palearktikumban (Európától Szibériáig és a Csendes-óceán partvidékéig). E nagy térségben a *V. murinus* populációi relatív genetikai homogenitást (1% alatti *cox1* szekvencia eltérést) tükröznek (Kruskop és mtsai, 2012), és parapatikus módon fordulnak elő keleti rokonával, a *V. sinensis* fajjal. Fontos körülmény az is, hogy a *V. murinus* kolóniái Ázsiában gyakoriak emberlakta településeken (épületekben), és keleti expanziójuk történelmileg összefügghetett az ember által megváltoztatott élőhelyek terjedésével (Kruskop és mtsai, 2012). Ez a denevérfaj kelet-nyugati és észak-déli irányban is vándorolhat (Orlova, 2014). Ezek a háttértényezők így lehetővé tették a fokozatos génáramlást (keveredést) az *A. vespertilionis* egymástól távoli, európai és közép-ázsiai populációi között, többek között akkor, amikor e denevérfajjal társult, ahogy ezt vizsgálati eredményeink tükrözik.

Ezzel szemben, mindkét itt vizsgált mitochondrialis marker (*cox1* és 16S rRNS gének) nagyfokú genetikai eltérést (vagyis redukált génáramlást) tükrözött Közép-Ázsia és Délkelet Ázsia (Vietnám) *A. vespertilionis* populációi között, ami kisebb távolság, mint a Közép-Európa és Közép-Ázsia közötti. Ez a kisebb arányú génkicserélődés legvalószínűbben földrajzi barrierékkal függhet össze (a Himalája magas vonulatai és a Tibeti-fennsík), amelyek elválasztják ezeket a térségeket és megakadályozzák, hogy denevérgazdáik révén az *A. vespertilionis* populációk keveredjenek.

Összességében, az *A. vespertilionis* molekuláris vizsgálatait egyes denevérpaszták (óvantagok és piroplasmák) "genetikai kapcsolatát" sejtetik Közép-Európa és Közép-Ázsia között az Észak-Palearktikumon keresztül. Tehát, a szóban forgó gazdapopulációk érintkeznek annyira, hogy – akár áttételesen – kórokozók illetve azok genetikai anyagának "cseréje" megvalósuljon. Más repülő gerincesekről (madarokról) már bebizonyosodott, hogy kullancs közvetítette kórokozók terjesztnek hasonló földrajzi összefüggésben (kelet-nyugati irányban), tehát a Távol-Kelet, Szibéria és Európa között (Moskvitina és mtsai, 2014; Ponomareva és mtsai, 2015). Fenti eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy az Eurázsia keleti és nyugati térségei közötti ökológiai kapcsolatnak a denevérek is szerves részei, és ennek járványtani jelentősége lehet más (nemcsak kullancs és óvantag közvetítette) kórokozók szempontjából is.

4.8.4. Madárkullancsokban azonosított babesiák genetikai hasonlósága Közép-Európa és a Távol-Kelet között

Előzmények

Közép-Európában a madarokról gyűjthető két leggyakoribb kullancsfaj az *Ixodes ricinus* és a *Haemaphysalis concinna* (Taragelová és mtsai, 2008; Dubska és mtsai, 2009; Špitalská és mtsai, 2011; Lommano és mtsai, 2014; 4.2.1. fejezet). Euráziában az *I. ricinus* földrajzi előfordulása a Nyugat-Palearktikumba esik, míg a *H. concinna* Közép- és Kelet-Ázsia térségeiben is honos (Lebedeva és Korenberg, 1981).

Közép-Európában a *H. concinna* adultok aktivitási csúcsa májusra tehető (4.3.2. fejezet). A lárvák júniustól jelennek meg a növényzeten, míg az áttelelő nymphák áprilistól aktívak (Nosek, 1971a). Így e régióban a lárvák illetve nymphák gazdakeresésének első hetei egybe esnek a hosszú illetve rövid távú vonuló madarak megérkezésével. A *H. concinna* lárvák és nymphák nyáron, az énekesmadarak fészkelési periódusában is aktívak, továbbá ősszel, a melegebb éghajlaton telelő madarak észak-északkeletről dél felé vonulása idején (Nosek, 1971a). Ezek a tényezők hozzájárulnak a vonuló és helyi madarak jelentőségéhez e kullancsfaj kisebb vagy akár nagyobb távolságba való eljuttatásában. Nem meglepő tehát, hogy a madarakat a *H. concinna* legfontosabb gazdái között tartják számon (Nosek, 1971a; 4.5.1. fejezet), és így feltételezhető, hogy e gazdacsoport a *H. concinna* által hordozott kórokozók terjesztésében is kiemelkedő szerepet játszhat.

Az emlősök babesiosisainak járványtanában a madarak nem mint kórokozó rezervoárok, hanem elsősorban mint a babesia-fertőzött kullancsok hordozói, terjesztői lehetnek fontosak (Hornok és mtsai, 2015b). Nemrég Ázsiából különféle új *Babesia*-genotípusokat írtak le (Rar és mtsai, 2014). Az elmúlt két évben ezen újonnan felismert szibériai és távol-keleti *Babesia*-genotípusok közül néhányat megtaláltak közép-európai *H. concinna* kullancsokban is: hazánkban növényzetről, míg Szlovákiában a növényzetről és rágcsálókról gyűjtött kullancsokban (Hornok és mtsai, 2015b; Hamsíková és mtsai, 2016). Vizsgálatunk célja az volt, hogy molekuláris módszerekkel megállapítsuk: e piroplasmák jelen vannak-e madarak *H. concinna* fajú kullancsaiban, ami megmagyarázhatná a Nyugat-Palearktikumban való előfordulásukat.

Molekuláris módszer: K

Eredmények és megbeszélés

Vizsgálatunkhoz 321 *H. concinna* lárvát és nymphát gyűjtöttünk 121 énekesmadárról, amelyek 19 fajba tartoztak (4.8.4.1. táblázat). A piroplasmákra PCR pozitív kullancsok aránya 15,9% (321-ből 51, CI: 12,1–20,4%) volt. PCR pozitivitást 11 madárfaj kullancsaiban találtunk (4.8.4.1. táblázat). Két olyan madárfajról (*Locustella luscinioides*, *Emberiza citrinella*), amelyek itt babesia-hordozó *H. concinna* kullancsokkal voltak fertőzöttek, már megállapítottuk, hogy e kullancsfajnak szignifikánsan gyakoribb gazdái, mint az *I. ricinus* fajnak (4.2.1. fejezet).

E piroplasmák (egy sikertelen szekvenálást leszámítva) molekulárisan 100%-ban (405/405 vagy 409/409 bp) azonosak voltak három *Babesia* genotípussal, amelyeket nemrég írtak le Szibéria déli részén (Bajkál-vidék) és Oroszország távol-keleti részében (Rar és mtsai, 2014). Az "Irk-Hc133" (eredetileg Irkutszkban, Szibériában találták meg) és a "Kh-Hs222" (Khabarovszk, Távol-Kelet) genotípusok voltak jelen a legtöbb itt vizsgált kullancsban (4.8.4.1. táblázat: "A" és "B"). E két *Babesia*-genotípust megtaláltuk gazdakereső *H. concinna* kullancsokban Magyarországon (Hornok és mtsai, 2015b), és leírták gazdakereső, valamint rágcsálókról gyűjtött *H. concinna* kullancsokból Szlovákiában (Hamsíková és mtsai, 2016). Újabb vizsgálatunk során azonban egy harmadik genotípust ("Irk-Hc130", szintén Irkutszkból: Rar és mtsai, 2014) is azonosítottunk három kullancsban (4.8.4.1. táblázat). Legjobb tudomásunk szerint ez utóbbi genotípust eddig nem mutatták ki Európában, és a három *Babesia*-genotípus egyikét sem találták meg még madarak kullancsaiban.

4.8.4.1. táblázat. A vizsgált madarak adatai és *Haemaphysalis concinna* kullancsaik piroplasma státusza. Az ismert fontos keleti vonulási és/vagy filogenetikai kapcsolattal rendelkező fajok nevének rövidítése vastag betűvel szerepel. Rövidítések: A - GénBank: KY471448, megegyezik a *Babesia* sp. Irk-Hc133 genotípussal (KJ486563 Irkutszkból, Szibéria); B - GénBank: KY471449, megegyezik a *Babesia* sp. Kh-Hc222 genotípussal (KJ486568 Khabarovszkból, Távol-Kelet); C - GénBank: KY471450, megegyezik a *Babesia* sp. Irk-Hc130 genotípussal (KJ486569 Irkutszkból, Szibéria).

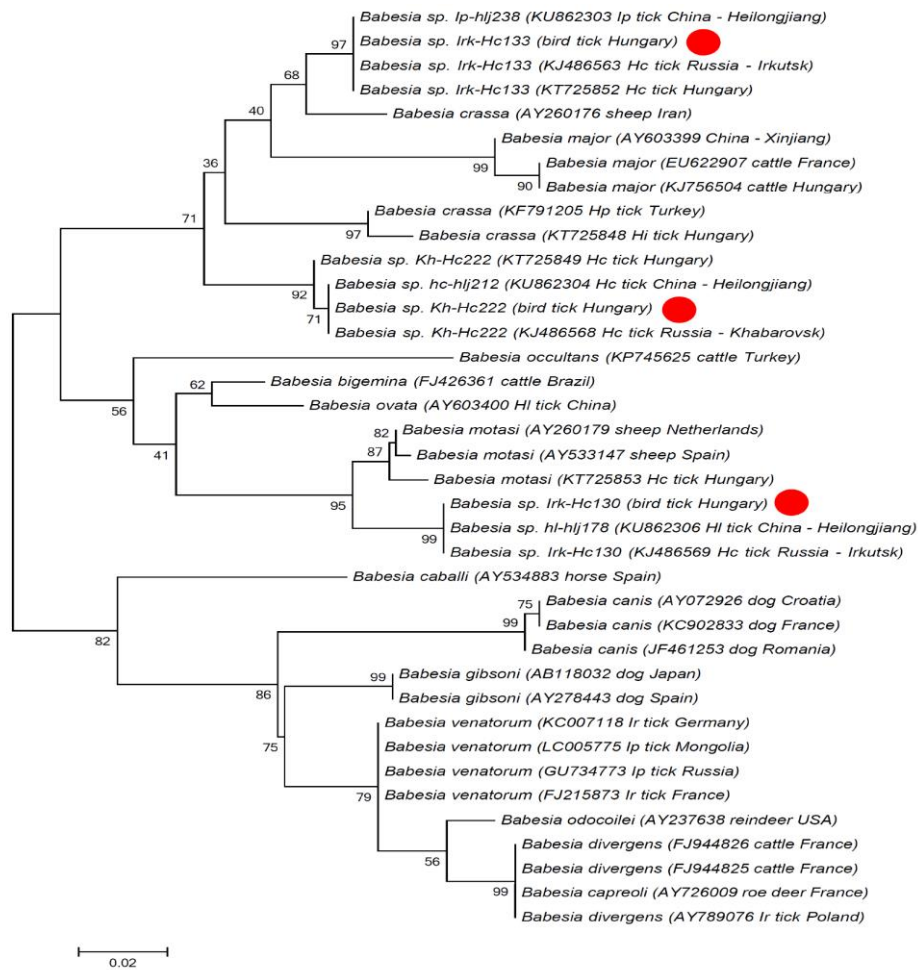
Szám	Madárfaj (n = kullancs fertőzött)	PCR pozitív kullancs/mind (százalék)	Azonosított piroplasma (szekvenciák száma)
1.	ACR ARU (1)	0/1	-
2.	ACR SCH (9)	2/32 (6%)	A (+ sikertelen)
3.	ACR SCI (6)	3/11 (27%)	A, B, C
4.	ACR PAL (6)	1/6 (17%)	A
5.	CAR CHL (1)	0/1	-
6.	COC COC (1)	0/2	-
7.	EMB CIT (2)	11/40 (28%)	A (10×), B
8.	ERI RUB (17)	2/18 (11%)	A, B
9.	LAN COL (1)	0/1	-
10.	LOC FLU (5)	1/7 (14%)	A
11.	LOC LUS (33)	15/99 (15%)	A (13×), B, C
12.	LUS MEG (1)	3/5 (60%)	B (3×)
13.	PAR MAJ (1)	0/1	-
14.	PRU MOD (6)	0/7	-
15.	SYL ATR (5)	2/22 (9%)	A (2×)
16.	SYL CUR (1)	0/1	-
17.	SYL NIS (1)	0/1	-
18.	TUR MER (12)	2/26 (8%)	A, C
19.	TUR PHIL (12)	9/40 (23%)	A (9×)

A törzsfán (4.8.4.1. ábra) a madárkullancsból azonosított Kh-Hc222 külön helyezkedett el attól a filogenetikai csoporttól, amelyet a madárkullancsból származó *Babesia* sp. Irk-Hc133, a *B. crassa* és a *B. major* alkotott, míg a *Babesia* sp. Irk-130 genotípust tartalmazó klád a *B. motasi* testvércsoportja volt. Összességében, mindhárom fenti genotípus a kérődzőket (Artiodactyla: Ruminantia) fertőző *Babesia*-fajok filogenetikai csoportjához tartozott. E három genotípus kórokozó-képessége nem ismert és (legjobb tudomásunk szerint) még nem is írták le őket a gazdacsoportból. Mindazonáltal valószínűsíthető, hogy a *H. concinna* egyedei hozzájuthatnak vadon élő kérődzőkből (különösen őzből) származó piroplasmákhoz, mivel hazánkban (is) ezek a cervidák a lárvá és a nympa stádium kedvelt gazdái (Hornok és mtsai, 2012b).

Nem volt szignifikáns különbség a PCR pozitív lárvák (17,2%: 157-ből 27) és nympák (14,6%: 164-ből 24) között. Figyelembe véve annak valószínűtlenségét, hogy a madarak az emlősöket fertőző piroplasmák rezervoárjai lennének, a lárvák PCR pozitivitása arra utal, hogy a fenti, Szibériából és a Távol-Keletről leírt *Babesia*-genotípusok (a *Babesia sensu stricto* csoport más tagjaihoz hasonlóan) transzovariálisan átvihetők és így fenn tudnak maradni *H. concinna* fajú kullancsokban. Ez a lehetőség jelentősen hozzájárulhat a piroplasmák nagyobb földrajzi távolságokban való fokozatos terjedéséhez.

A *H. concinna* fajú kullancsok PCR pozitivitása szignifikánsan ($P = 0,003$) ritkább volt a tavaszi időszakban (2,5%: 40-ből egy), mint nyáron (17,6%: 255-ből 45) vagy ősszel (19,2%: 26-ből öt). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a *H. concinna* fajhoz társult piroplasmák terjesztésében a hazánkba tavasszal, délről érkező vonuló madarak a legkevésbé fontosak; szemben azokkal, amelyek északról, északkeletről érkeznek Magyarországra a nyár végén, illetve ősszel.

4.8.4.1. ábra (túldal). *Babesia*-fajok 18S rRNS génre épülő törzsfája (piros pöttyök: saját minták).



A *H. concinna* Eurázsia-szerte elterjedt kullancsfaj (Lebedeva és Korenberg, 1981; Rubel és mtsai, 2018). Lárvai és nymphái egyidejűleg csak a nyár és az őszi folyamán (októberig) aktívak (Nosek, 1971a), ami megerősíti, hogy e kullancsfaj hosszabb távú, madarak általi terjesztésében az őszi vonulás a legfontosabb. A *H. concinna* lárvai, nymphái legfeljebb hat napig szívhatnak vért (Meng és mtsai, 2014), amely időtartam alatt madár gazdáik akár néhány száz kilométert is megtehetnek (az énekes-madarakra jellemző vonulási sebesség napi 27-75 km, de lehet akár 300 km is: Newton, 2008).

A piroplasma PCR pozitív *H. concinna* lárvákat, nymphákat szignifikánsan ($P = 0,002$) gyakrabban gyűjtöttük négy olyan madárfajról, amelynek ismert keleti vonulási kapcsolatainak vannak (92 kullancsból 24), mint más fajokról (229 kullancsból 27) (4.8.4.1. táblázat), ami a fenti összefüggésben betöltött öko-járványtani szerepük mellett szól. E négy madárfajon a PCR pozitív kullancsok aránya 14-60% volt (4.8.4.1. táblázat).

A vizsgálatunkban babesia-hordozónak talált *H. concinna* példányok terjesztésében kulcsszerepet játszó madárfajok keleti kapcsolatai jól dokumentáltak. (1) A citromsármány (*Emberiza citrinella*) hazánkban gyűrzött példánya már 2800 km-re keletre, Oroszországban is előkerült (Csörgő és mtsai, 2009). A földrajzi térség, ahol e madárfaj honos, a szibériai Irkutszk régióig húzódik (Irwin és mtsai, 2009), tehát az itt kimutatott *Babesia*-genotípusok közül kettő származási helyéig. (2) A hazai fülemülék (*Luscinia megarhynchos*) kelet-európai vagy ázsiai populációkból származhatnak, amint ezt filogenetikai módszerekkel kimutatták (Ács és Kováts, 2013). (3) A nádi tücsökmadár (*Locustella luscinoides*) vizsgálatunkban 15% arányban hordozott PCR pozitív kullancsokat (4.8.4.1. táblázat). E madárfaj Nyugat-Palearktikumban élő populációi filogenetikailag közelebb állnak az ázsiai bozót-posztátákhoz (*Bradypterus*-fajok), mint egyes kongenerikus társaikhoz (*Locustella*-fajokhoz) (Drovetski és mtsai, 2004). A nádi tücsökmadár és több más, hosszú távon vonuló faj Közép-Ázsia térségei felől keleti vagy nyugati irányban terjeszkedett a posztglaciális újranépesülés során, ahogy ezt jelenkori populációik filogeográfiai összehasonlítása tükrözi (Irwin és Irwin, 2005).

Továbbá, az elmúlt években-évtizedekben folyamatos növekedés volt megfigyelhető a Magyarországon felbukkanó új madárfajok számában, és ezek egy jelentős része keleti eredetű volt, így Türkmenisztán és Mongólia (Csörgő és mtsai, 2009) vagy Kelet-Európa, Közép-Ázsia illetve Szibéria más térségeiből (legutóbb: 2017 elején a szibériai szürkebegy, 2018 végén a lazúrcinege; a Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület adatai alapján).

Másfelől, a nem vagy csak részben vonuló madárfajokról (például feketerigóról: *Turdus merula*, 4.8.4.1. táblázat) a *H. concinna* aktivitási csúcának idején gyűjtött kullancsok PCR pozitivitása azt támasztja alá, hogy a vizsgálatunkban kimutatott szibériai és távol-keleti *Babesia*-genotípusok fenn tudnak maradni Közép-Európában. Ezt jól tükrözi regionális jelenlétük a növényzetről gyűjtött, gazdakereső kullancsokban (Hornok és mtsai, 2015b).

A babesia-hordozó kullancsok gazdaspektruma nagyon fontos lehet ebben az összefüggésben. Azon *Haemaphysalis*-fajú kullancsok, amelyek jellemzően nem fordulnak elő hosszú távon vonuló/vándorló gazdafajon (például madarakon), megfigyeléseink szerint filogeográfiailag jelentősen különböznek Eurázsia távoli térségei között, amint ezt a *H. erinacei* példázza (4.2.3. fejezet). Ezzel szemben a *H. concinna*, amelynek kiemelten fontos gazdái a madarak, minimális genetikai eltérést mutat Európa és Kelet-Ázsia között (4.2.1. fejezet).

Következtetésképpen, vizsgálatunk eredményei azt mutatják, hogy a madarak jelentős szerepet játszhatnak azon *Babesia*-genotípusok terjesztésében, amelyeket egy Eurázsia-szerte honos kullancsfaj, a *H. concinna* hordoz. Ezt az is alátámasztja, hogy babesia DNS-t gyakrabban találtunk olyan madárfajokról gyűjtött kullancsokban, amelyek jelenkori illetve földtörténeti "keleti kapcsolatukról" ismertek, tehát keleti irányban (is) vonulnak és/vagy kelet- és nyugat-eurázsiai populációik között filogenetikailag megalapozott rokonság áll fenn. Ugyanakkor a *H. concinna* fő (adultra jellemző) aktivitási periódusában a rezidens madarokról gyűjtött babesia-hordozó kullancsok a szóban forgó szibériai és távol-keleti *Babesia*-genotípusok közép-európai megtelepedése, állandó jelenléte mellett szólnak. A törzsfán e piroplasmák szekvenciái a kérődzőket fertőző *Babesia*-fajokkal egy csoportban helyeződnek, jóllehet még egyiket sem mutatták ki kérődzőkből. Ezért a közeljövő fontos feladata, hogy azonosítsák ezeknek a keleti *Babesia*-genotípusoknak a gazdafajait és az azokban kifejtett esetleges kórtani hatásukat.

4.8.5. A *Rhipicephalus sanguineus* s.l. filogenetikai megosztottsága a Kelet- és a Nyugat-Mediterráneum között

Előzmények

A *Rhipicephalus sanguineus* (*sensu lato*) (Acari: Ixodidae) egy legalább 17 kullancsfajból álló komplexhez tartozik, közöttük számos orvosi, állatorvosi jelentőségű fajjal (Dantas-Torres és mtsai, 2013). A csoport típusfajának korábban a *R. sanguineus* (*sensu stricto*)-fajt (angolul: *brown dog tick*) tekintették, amely melegebb éghajlati körülmények között világszerte elterjedt, nagyfokú alkalmazkodóképességének köszönhetően (vö. egyszerre endofil-exofil, tehát zárt [épület, kennel] és nyílt, városi vagy természetes élőhelyeken egyaránt előfordul; egész évben jelen lehet, évente akár négy generációval; sőt aktív és passzív gazdakeresésre is képes) (Dantas-Torres, 2010). Bár jellemzően kutya élősködő (mindhárom fejlődési stádiumában), a *R. sanguineus* számos vadon élő és házi állatfajt fertőzhet, még az embert is. Többféle (köztük zoonótikus) kórokozó vektora lehet (Dantas-Torres, 2008). Mivel a melegebb éghajlati körülményeket kedveli, szakmai körökben úgy vélik, hogy a globális felmelegedés következtében a *R. sanguineus* elterjedési területének határa északabbra fog tolni (Dantas-Torres, 2010).

Jelen tudásunk szerint a *R. sanguineus* fajnév nem használható *sensu stricto* értelemben (mivel típuspéldánya nem ismert, újat pedig még nem jelöltek ki), a *sensu lato* pedig sem morfológiailag, sem molekulárisan nem egységes faj (Szabó és mtsai, 2005; Liu és mtsai, 2007; Dantas-Torres és mtsai, 2013). A *R. sanguineus* két, valószínűleg külön fajt jelentő filogenetikai csoportját "trópusi" vagy északi és "mérsékelt égövi" vagy déli vonalnak nevezték el dél-amerikai tanulmányok alapján, majd ezeken belül további taxonómiai egységek létezését tárták fel (Dantas-Torres és mtsai, 2013).

4.8.5.1. táblázat. A vizsgálatunkban felhasznált kullancsok adatai.

<i>Rhipicephalus</i> sp. ¹	Ország	Hely	Gazdafaj	COI szekvencia azonoság ³	COI szekvencia génbanki száma	Azonos szekvenciák száma	16S szekvencia génbanki száma	
"R. sanguineus"	Szerbia	Kajtasovo	kutya	630/630 ²	KX757879		KX793717	
		Brnjica	kutya	630/630 ¹	KX757880		KX793718	
		Jajinci	kutya	629/630, 630/630 ¹	KX757881-2		KX793719	
	Horvátország	Petnica	kutya	629/630 ²	KX757883		KX793720	
		Lebane	kutya	629/630 ¹	KX757885		KX793722	
		Boka	kutya	628/630, 629/630 ¹ 629/630 ²	KX757905-7		KX793738-9	
		Rovinj	nem ismert	630/630 ²	KX757887	2×	KX793724	
	Magyarország	Pula	kutya	629/630, 630/630 ²	KX757888-9		KX793725-6	
		Zágráb	kutya	629/630, 630/630 ² 628/630 ³	KX757890, -3, -6	1×, 2×, 2× uas.	KX793727, -30	
	"R. rossicus"	Málta	Zadar	kutya	629/630 ²	KX757892	2×	KX793729
Sibenik			kutya	629/630 ²	KX757895		KX793731	
Románia		Babadag	aranyakál	630/630 ¹	KX757915		KX793746	
		Histria	kutya	628/630 ¹	KX757916		KX793746	
Görögország		Szeksárd ²	kutya	628/630 ²	KX757901	2×	KX793734	
		Siggiewi	kutya	630/630 ²	KX757902	6×	KX793735	
Algéria		Piacenza	kutya	630/630 ² 626/630 ³	KX757903-4		KX793736-7	
		Tessaloniki	kutya	629/630 ¹	KX757908	2×	KX793740	
<i>R. leporis</i>		Marokkó	Kehf Lagareb	<i>Myotis punicus</i>	630/630 ²	KX757910		KX793742
			Al-Hoceima	kutya	623/630 ³	KX757909		KX793741
	Elefántcsontpart	Abidjan	kutya	620/620 ⁴	KX757914		KX793745	
		Caraoorman	kutya	624/630 ⁵	KX757897		KX793732	
	Kenya	Lazuri	kutya	628/630, 630/630 ⁵	KX757898-9		KX793733	
		Grindul	kutya	629/630 ⁵	KX757900		-	
	Elefántcsontpart	Turkana, Samburu	kutya, szmha	627/630 ⁶	KX757911	4×	KX793743	
		Bas-Sassandra	kutya	627/630, 625/630, 625/630 ⁶	KX757912-3, -7	1×, 1×, 2× uas.	KX793744	

²A *R. sanguineus* hazánkban még nem tekinthető honosnak; ezek a minták (amelyeket 2012-ben gyűjtöttek egy helyi kutyáról) a ritka autochthon eseteket példazzák.

³A referencia szekvenciákkal azonos nukleotidok száma (bp/bp). A referencia szekvencia sorszáma itt fekete körben szerepel (a 4.8.5.1. ábrán pedig színes háttérrel) a következők szerint: ¹KF219745, ²KU556745, ³AF081829, ⁴KF200084, ⁵JX394215, ⁶KM235720. Rövidítés: uas. – ugyanabban a sorrendben.

Úgy tűnik, a *R. sanguineus* eddigi vizsgálataiban egyes kontinentális térségek nem szerepeltek kellő hangsúllyal, tehát vagy egyáltalán nem, vagy csak kis számú mintával. Ezt példázzák Európában a mediterrán térség országai. Így vizsgálatunk elsődleges célja az volt, hogy az eddigi közleményekben kevésbé képviselt országokból szolgáltatassunk adatokat, vagyis, hogy filogeográfiai értelemben összehasonlítsuk a *R. sanguineus* két mitochondrialis genetikai markerét olyan mintákból, amelyeket Magyarországon, a balkáni országokban és a Földközi-tenger más térségeiben, továbbá Kelet-Afrikában gyűjtöttünk. Ily módon a *R. sanguineus* trópusi ("tropical") és mérsékelt égövi ("temperate") vonala is szerepelt munkánkban.

Molekuláris módszerek: A, B

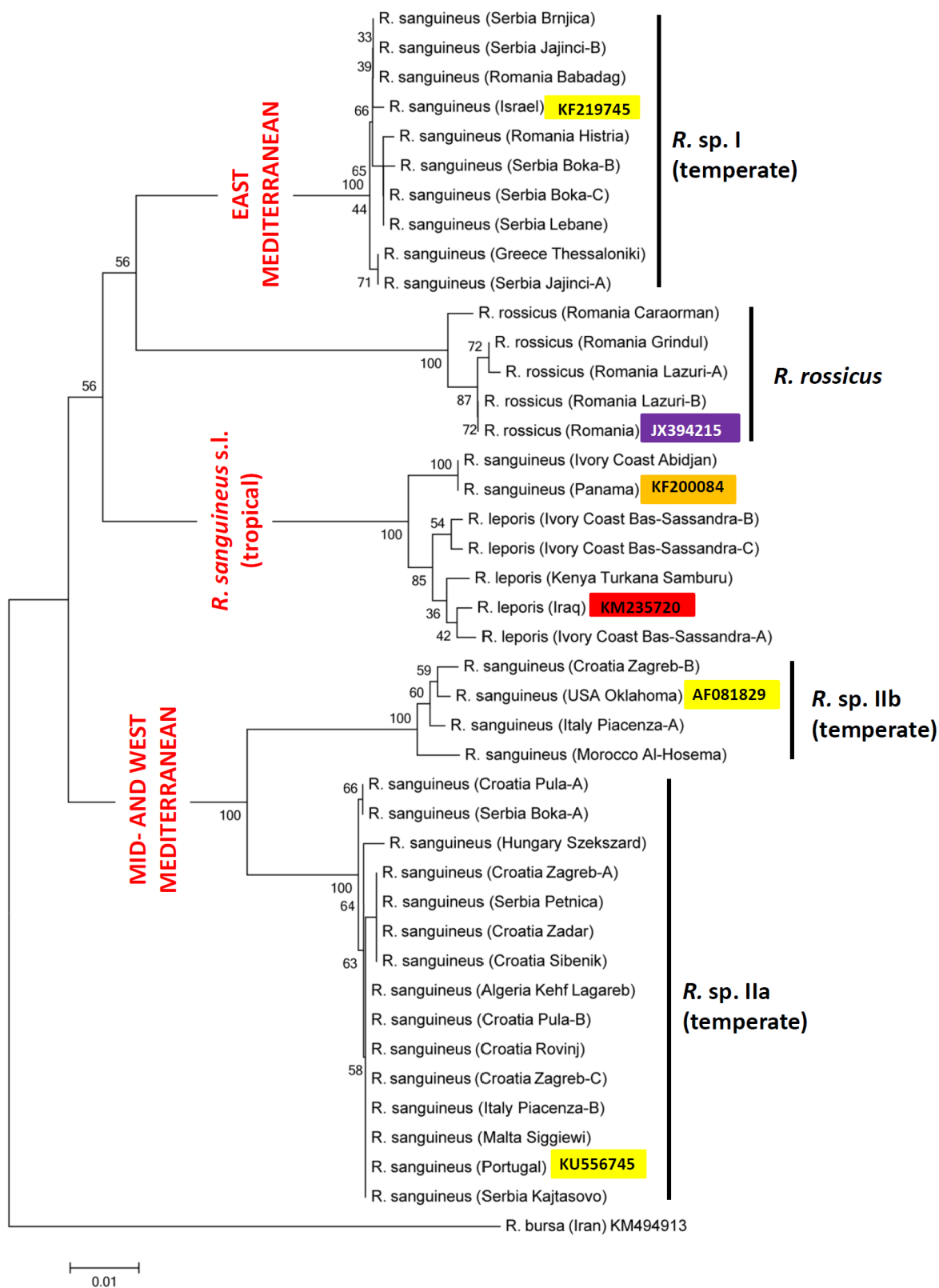
Eredmények

Az 50 molekulárisan vizsgált kullancs közül a *cox1* és a 16S rRNS gének felerősített szakasza alapján 38 példányt azonosítottunk "*R. sanguineus*" fajúként (tehát ezek a "mérsékelt égövi" vonalon belül a *Rhipicephalus* sp. I és II, illetve a "trópusi" vonalnak megfelelő *R. sanguineus* s.l. csoportba tartoztak). A *Rhipicephalus* sp. I *cox1* szekvenciái egy-három nukleotid eltérést mutattak (vagyis 627–630/630 bp = 99,5–100% szekvencia azonosság). A *Rhipicephalus* sp. IIa alcsoportban is hasonló volt a helyzet (627–630/630 bp, azaz 99,5–100% szekvencia azonosság), míg a *Rhipicephalus* sp. IIb alcsoport heterogénebbnek bizonyult, akár hét nukleotid eltéréssel (623/630 bp = 98,9% szekvencia azonosság). A két *Rhipicephalus* sp. II alcsoportot összehasonlítva ("a" vs. "b") a haplotípusok között 28-32 bp eltérést mutattunk ki, ami 94,9–95,6% (598–602/630 bp) szekvencia azonosságot jelent. A *cox1* szekvenciák 56-60 nukleotidban tértek el a *Rhipicephalus* sp. I és II között (570–574/630 bp, azaz 90,5–91,1% azonosság).

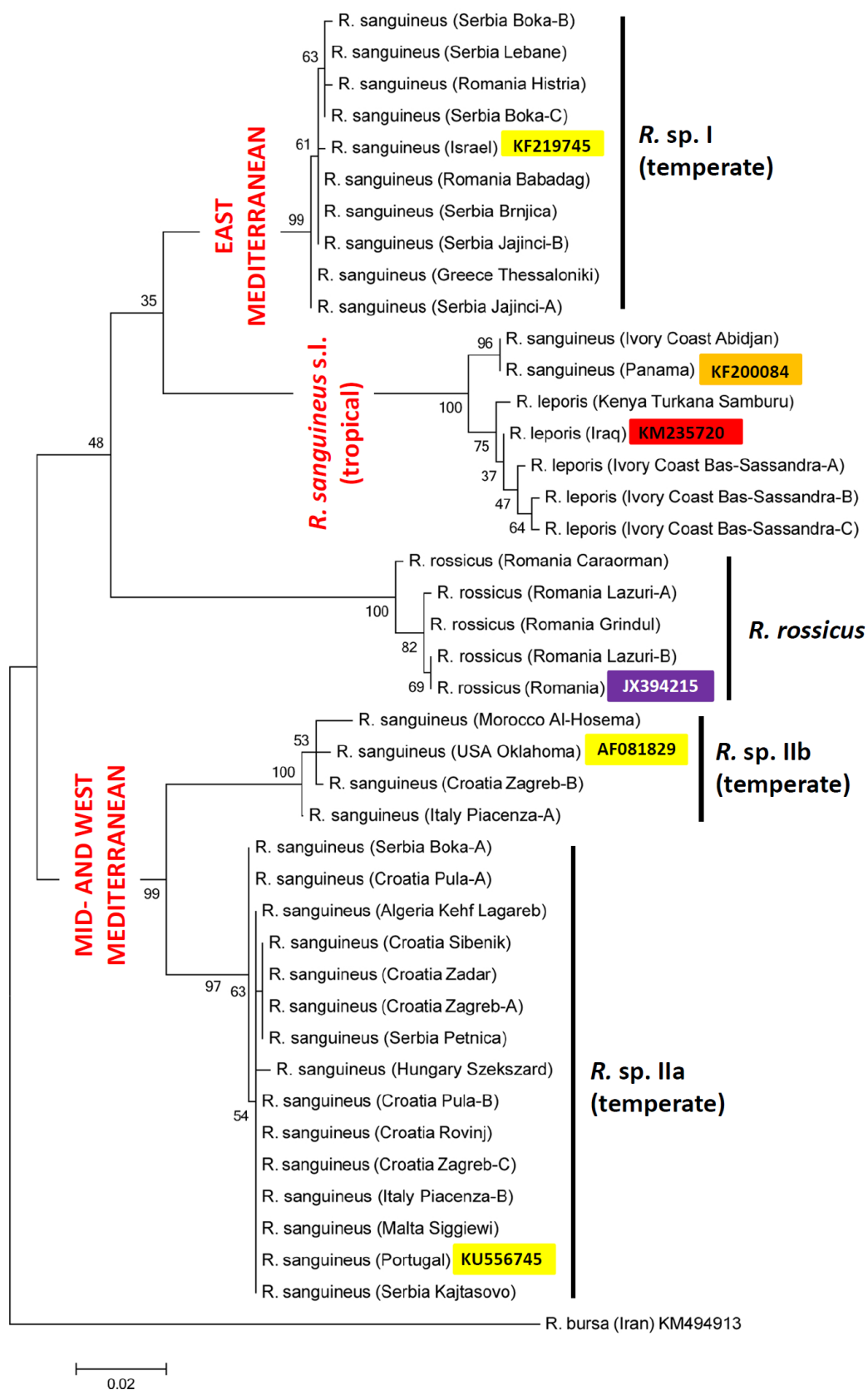
A *cox1* szekvenciák filogenetikai elemzése azt mutatta, hogy az általunk vizsgált *Rhipicephalus* sp. I haplotípusok egy kládba tartoznak (4.8.5.1. és 4.8.5.2. ábra). Másfelől, a *Rhipicephalus* sp. II szekvenciái két alcsoportot alkottak, amelyek elkülönültsége erős támogatottságú volt (99-100%: 4.8.5.1. és 4.8.5.2. ábra). Ezeket a viszonyokat a 16S rRNS törzsfa is megerősítette, mivel a haplotípusok ezen is két nagy csoportban helyezkedtek el (*Rhipicephalus* sp. I és II) a "mérsékelt égövi" vonalon belül (4.8.5.3. és 4.8.5.4. ábra), jóllehet a *Rhipicephalus* sp. IIa és IIb elkülönültsége (e rövidebb szekvenciák alapján) alacsonyabb (53%) *bootstrap* értéket kapott az ML analízisben (4.8.5.4. ábra).

Földrajzilag, a *Rhipicephalus* sp. I mintái csak a Kelet-Mediterráneumból kerültek elő, hasonlóan e csoport hozzáférhető génbanki szekvenciáihoz (4.8.5.5. ábra). Komplementaritásban ezzel, a *Rhipicephalus* sp. IIa alcsoport mintái a Közép- és Nyugat-Mediterráneumhoz tartoztak (illetve Magyarországon is ezt találtuk meg), és a *Rhipicephalus* sp. I csoporttal átfedő zónát képeztek Szerbiában. A *Rhipicephalus* sp. IIb földrajzi előfordulása fokális volt a *Rhipicephalus* sp. IIa elterjedési területén belül (Észak-Marokkóban, Olaszországban és Horvátországban Zágrábnál: 4.8.5.5. ábra).

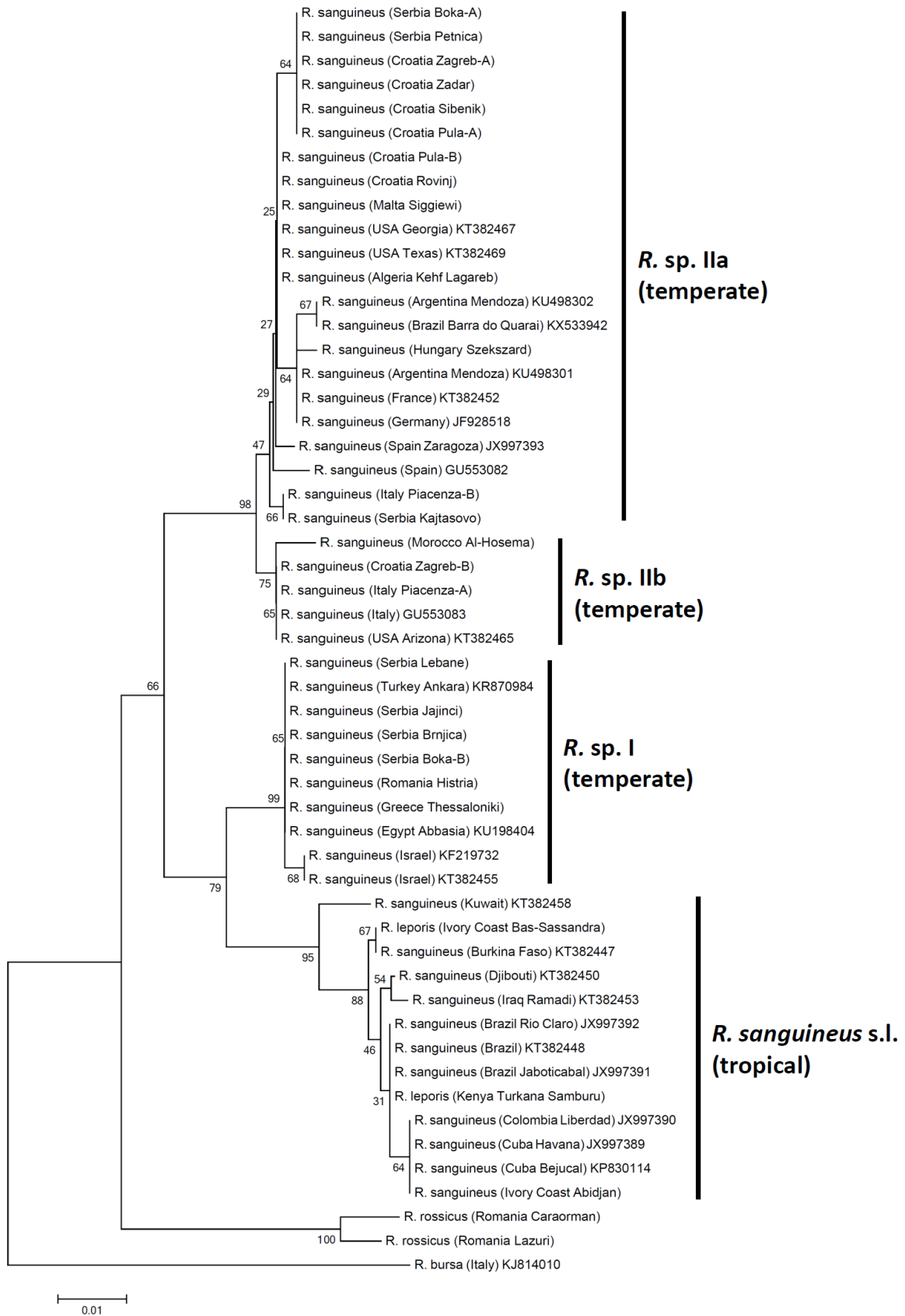
Mindössze egy minta volt Elefántcsontpartról, amelyet *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.), azaz "trópusi" vonalba tartozóként azonosítottunk genetikailag. E kullancs *cox1* szekvenciája 100%-ban csak egy génbanki szekvenciával volt azonos, amely Közép-Amerikából származott (Panama: KF200084). A *cox1* gén alapján a Kenyából és Elefántcsontpartról származó minden további (összesen nyolc) kullancs (4.8.5.1. táblázat) filogenetikailag a *R. leporis* fajjal együtt csoportosult (4.8.5.1. és 4.8.5.2. ábra). A *R. leporis* vizsgálatunkban morfológiailag azonosított hímjeinek légzőnyílás lemeze nagyon hosszú és keskeny dorsalis nyúlvánnyal rendelkezett, és könnycsepp alakú, hátul lekerekített adanalís lemezük volt (4.8.5.6. ábra). E minták *cox1* szekvenciáinak génbanki referencia szekvenciához (Irak: KM235720) hasonlítása megerősítette, hogy a *R. leporis* fajba tartoznak (624-626/629 bp = 99,2-99,5% azonosság). A *R. leporis* és a *R. sanguineus* (s.l.) ("trópusi" vonal) *cox1* szekvenciái ugyanakkor tíz nukleotid különbséget mutattak (620/630 bp; 98,4% azonosság) országon (Elefántcsontpart) belül, és filogenetikai elkülönülésük magas (100%) támogatottságot kapott (4.8.5.1. és 4.8.5.2. ábra).



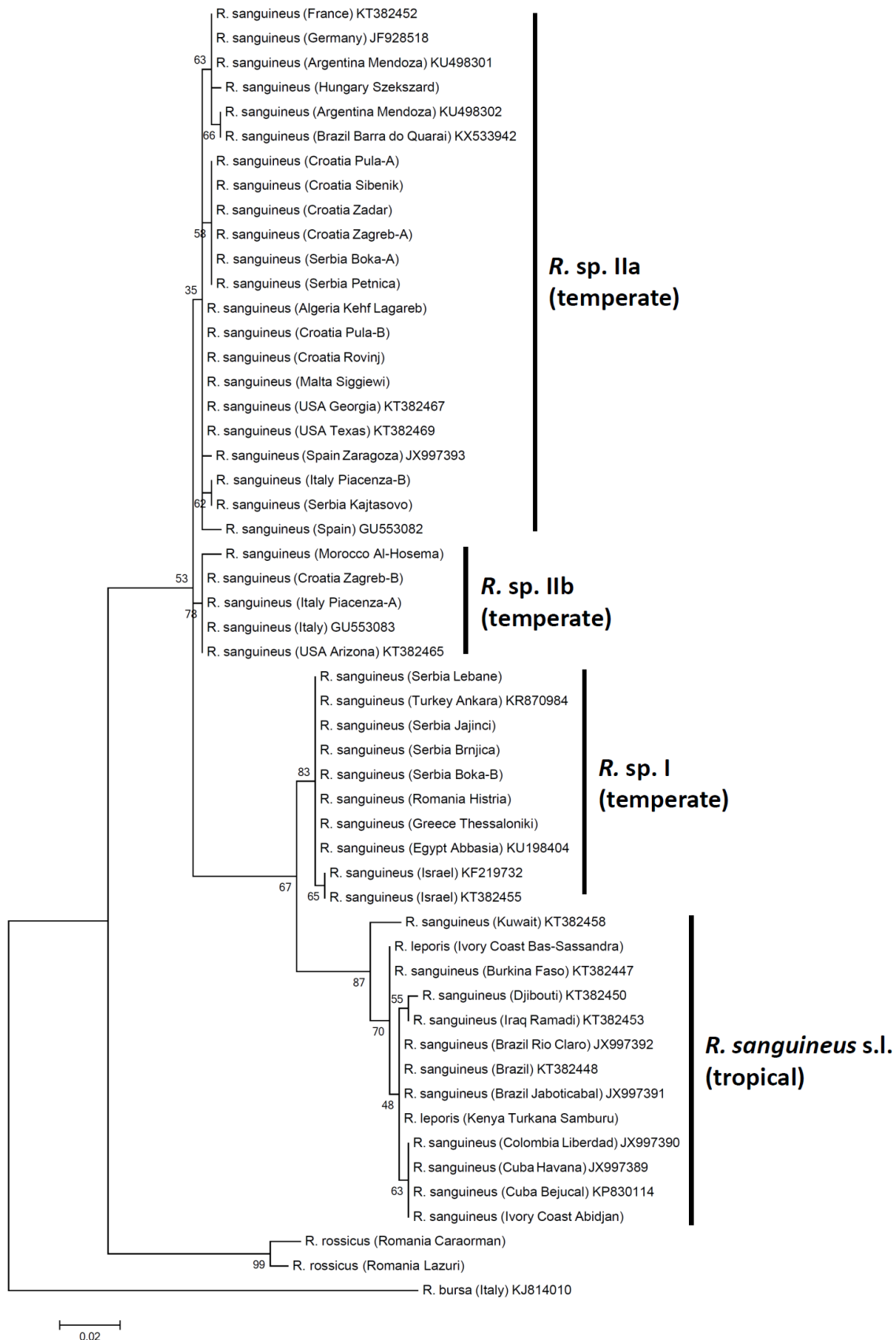
4.8.5.1. ábra. A *Rhipicephalus sanguineus* cox1 szekvenciák Neighbor-Joining törzsfája. A saját szekvenciák mellett nincs génbanki szám. A referencia szekvenciák színes háttérűek.



4.8.5.2. ábra. A *Rhipicephalus sanguineus* cox1 szekvenciák ML törzsfája. A saját szekvenciák mellett nincs génbanki szám. A referencia szekvenciák színes hátterűek.



4.8.5.3. ábra. A *Rhipicephalus sanguineus* 16S rRNS gén szekvenciák Neighbor-Joining törzsfája. A saját szekvenciák mellett nincs génbanki szám.



4.8.5.4. ábra. A *Rhipicephalus sanguineus* 16S rRNS gén szekvenciák ML törzsfája. A saját szekvenciák mellett nincs génbanki szám.

A 16S rRNS gén szekvencia analízisben a *R. leporis* és a *R. sanguineus* (s.l.) ("trópusi" vonal) közötti eltérés nem volt ilyen nyilvánvaló. Például, csupán egy nukleotid különbség volt a kelet- és nyugat-afrikai *R. leporis* példányok között (Kenya vs. Elefántcsontpart). Az ez utóbbi országból származó *R. leporis* nem különbözött egy *R. sanguineus* haplotípustól (GénBank: KT382447), amelyet a szomszédos Burkina Fasoban gyűjtöttek, de mindkettő öt nukleotid eltérést mutatott (ami 394/399 bp; 98,7% azonosságnak felel meg) a Kuvaitból származó *R. sanguineus* (s.l.) szekvenciájától (GénBank: KT382458). Filogenetikailag, a *R. leporis* 16S rRNS haplotípusai ez utóbbtól külön csoportosultak, de együtt a *R. sanguineus* (s.l.) ó- és újvilági izolátumaival (4.8.5.3. és 4.8.5.4. ábra).

A *R. rossicus* csak Romániában került elő (négy minta képviselte: 4.8.5.1. táblázat). A *cox1* szekvenciáik Neighbor-Joining analízisében (4.8.5.1. ábra) ez a faj a kelet mediterrán *Rhipicephalus* sp. I testvércsoportjaként helyezkedett el. Ezzel szemben, a 16S rRNS gén alapján a *R. rossicus* valamennyi *R. sanguineus* izolátum testvércsoportját alkotta (4.8.5.3. és 4.8.5.4. ábra).



4.8.5.5. ábra. A *Rhipicephalus* sp. I (sárga körök), IIa (piros körök) és IIb (lila körök) *cox1* haplotípusok területi eloszlása a Földközi-tenger térségében.

Megbeszélés

Egy korábbi, a *R. sanguineus* morfológiai és genetikai sokféleségéről szóló átfogó tanulmány szerint a "mérsékelt égövi" vonalon belüli két csoport (*Rhipicephalus* sp. I és II) molekulárisan annyira különbözik egymástól, hogy más fajúnak kellene tekinteni őket (Dantas-Torres és mtsai, 2013). Mindazonáltal, az adanalízis lemez hossz/szélesség arányán kívül nem találtak következetesen eltérő morfológiai különbséget közöttük. Ezzel szemben, vizsgálatunk szerint az adanalízis lemez hossz/szélesség aránya még közel azonos *Rhipicephalus* sp. I haplotípusok között is jelentősen eltért (1 bp különbség mellett ez az érték 2 vs. 2,7 volt). Ezért földrajzi eloszlásuk vizsgálatához a minták haplotípusát (hovatartozását) kizárólag molekuláris alapon állapítottuk meg, két mitochondrialis genetikai marker elemzésével. Munkánk során az is bebizonyosodott, hogy – a *Rhipicephalus* sp. I-gyel ellentétben – a *Rhipicephalus* sp. II meglehetősen heterogén, és két, filogenetikailag jól definiálható kládból (a + b) áll. A 16S rRNS szekvenciák filogenetikai analízise azt is igazolta, hogy ezeket a rendszertani kategóriákat korábban között újvilági szekvenciák is képviselik. Így a filogenetikailag *Rhipicephalus* sp. IIa-ként besorolt klád szekvenciákat tartalmazott Argentínából, Brazília legdélebbi részéből és az USA-ból (Georgia, Texas),

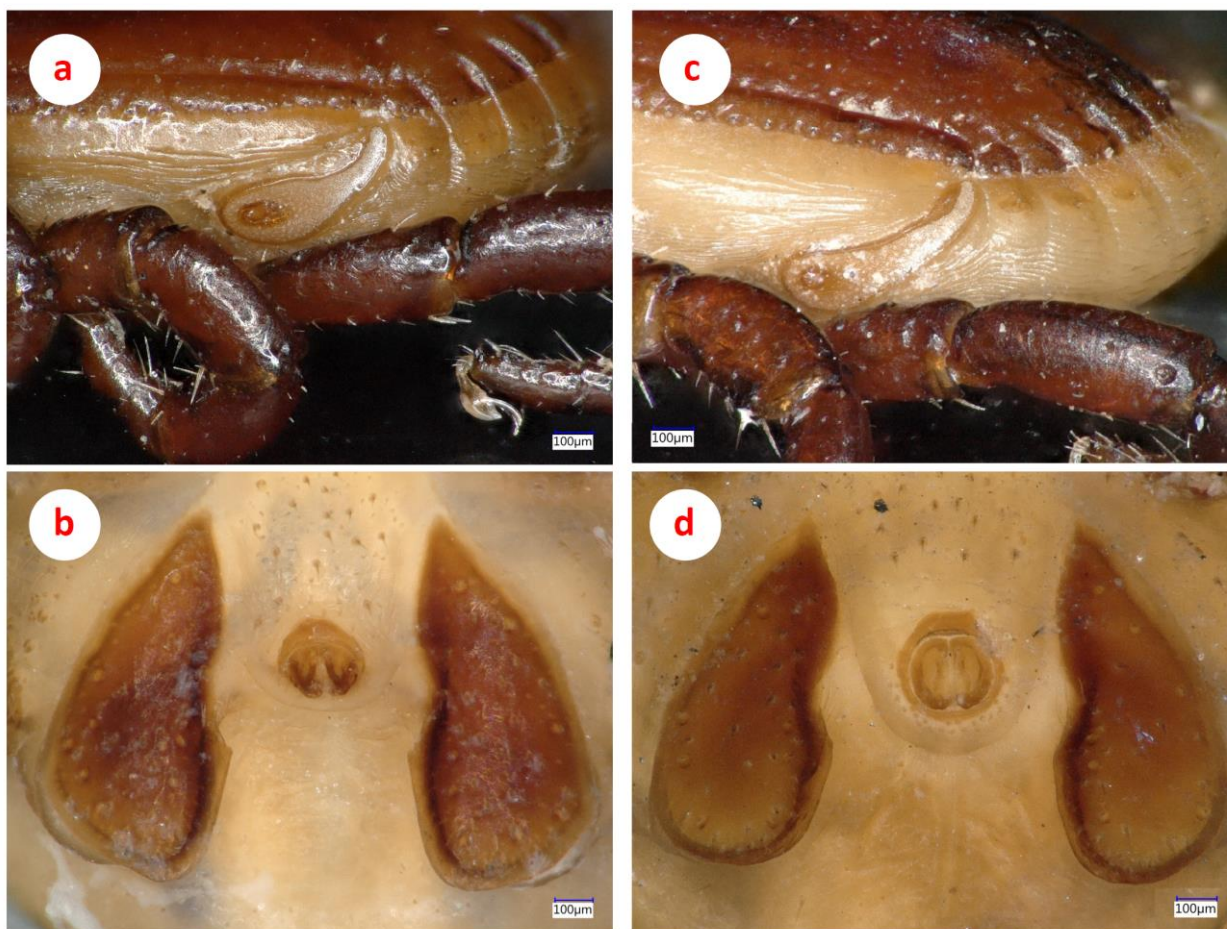
mialatt egy másik észak-amerikai 16S rRNS szekvencia (Arizónából), illetve egy oklahómai *cox1* szekvencia a *Rhipicephalus* sp. IIb-be tartozott (4.8.5.1-4. ábrák).

A *R. sanguineus* "trópusi" és "mérsékelt égövi" vonalairól ismert, hogy földrajzi előfordulásuk mintázata függ a szélességi körtől (Dantas-Torres és mtsai, 2013; Burlini és mtsai, 2010). Ezen túlmenően itt azt is bebizonyítottuk, hogy a "mérsékelt égövi" vonalon belül a *Rhipicephalus* sp. I és II előfordulása hosszúsági kör szerint is elkülönül, legalábbis a Földközi-tenger térségében. A *cox1* szekvenciák alapján azt is kimutattuk, hogy a *R. rossicus* faj filogenetikailag közel áll a kelet-mediterrán *Rhipicephalus* sp. I-hez, ami jól egyezik azzal a megfigyeléssel, hogy a *R. rossicus* kelet-európai előfordulása, és terjedőben van nyugat felé (Mihalca és mtsai, 2015). E vizsgálatban a *Rhipicephalus* sp. I és II mitochondrialis vonalhoz tartozó kullancsok túlnyomó többségét egyöntetű, mediterrán klímájú országokban gyűjtöttük (sőt Szerbiában e két csoport haplotípusait egyazon helyen is megtaláltuk), és a *Rhipicephalus* sp. II filogenetikailag elkülönült két alcsoportjának (a + b) képviselői néhány helyen szimpatrikusan (együtt) is előfordultak (Piacenza: Olaszország, Zágráb: Horvátország). Ebből fakadóan, a *Rhipicephalus* sp. I, IIa és IIb földrajzi előfordulásának mintázata a Mediterráneumban a jelenleg fennálló klimatikus tényezőktől függetlennek tűnik, szemben a "trópusi" és "mérsékelt égövi" vonalak korábbiakban (és máshol) megfigyelt, leírt földrajzi eloszlásával (Zemtsova és mtsai, 2016).

Ha nem a jelenlegi klimatikus körülmények, akkor a kullancsok életciklusát befolyásoló más tényezők adhatnak magyarázatot a *Rhipicephalus* sp. I és II mitochondrialis vonalak parapatrikus elkülönülésére a mediterrán térségben. A gerinctelen és gerinces taxonok széles köre (így kullancsfajok és gazdáik) által szolgáltatott molekuláris bizonyítékok arra utalnak, hogy Európa déli félszigetei fő menedékhelyekként (refúgiumokként) funkcionálhattak a jégkorszak(ok) idején, amelyekből genetikailag eltérő csoportok jöttek létre (Hewitt, 1999). Noha az Európa északi részei felé történő újranépesülés eseményei e csoportok számára másodlagos szimpátriát eredményezhettek, genetikai különbségeik mindmáig fennmaradtak és kimutathatóak. Így a *R. sanguineus* több (potenciális) gazdafaja is hasonló glaciális izolációnak lehetett kitéve. Például, a szürkefarkasok haplotípus vonalai és a sünfajok (nyugati vs. keleti) különböznek Olaszország és a Balkán között (Hewitt, 1999; Verginelli és mtsai, 2005), továbbá a vöröshátú erdei pocoknak genetikailag eltérő populációi léteznek a Nyugat- és Kelet-Balkánon (Kotlík és mtsai, 2006). Ezek a földrajzi mintázatok hasonlóak ahhoz, amit jelen vizsgálatunk során a *R. sanguineus* sp. I és II esetében megfigyeltünk. Ez arra utal, hogy a jégkorszak(ok) idején a *R. sanguineus* Földközi-tenger mentén beszűkült elterjedési területe – a fenti gazdafajokkal szimpátriában – nem volt egységes, hanem reprodukciós izolációban élő kullancspopulációkból állt. Mindazonáltal azt is igazolták, hogy mesterséges körülmények között a *Rhipicephalus* sp. I és IIb populációkba tartozó kullancsok között (amelyek izraeli és észak-amerikai, oklahómai referencia szekvenciákként szerepelnek a 4.8.5.1-2. ábrákon) kereszteződés (génkicserélődés) is lehetséges (Levin és mtsai, 2012). Ez azonban nem bizonyítja, hogy mindez természetes körülmények között is rendszeresen megvalósul (vö. számos példája ismert a fajok közötti keresztezhetőségnek).

A *R. leporis* kullancsfajról eddig úgy tudták, csak a Közel-Keleten és Közép-Ázsiában fordul elő, így itt morfológiailag és genetikailag azonosított mintáit először találtuk meg Afrikában. Eltekintve a vadon élő állatfajok széles körétől, e kullancsfaj kedvelt gazdái között a kutya és a kecske is szerepel (Walker és mtsai, 2000). Következésképpen, a *R. leporis* e két gazdafaj szállításával észrevétlenül is átkerülhetett olyan térségekbe, ahol előfordulása korábban ismeretlen volt, és nem szükségszerűen mostanában (főképp az Irakból vs. Kenyából, Elefántcsontpartról származó mintáinak genetikai távolságát figyelembe véve). Ha később ez megerősítést nyer, annak valószínű magyarázata, hogy eddig miért nem fedezték fel a *R. leporis* fajt Afrikában, a *R. sanguineus* (s.l.) vonalhoz való morfológiai hasonlósága. Vizsgálatunkban a *R. leporis* és a *R. sanguineus* (s.l.) vagy "trópusi" vonal filogenetikailag egymáshoz közel helyeződött, mindössze 1,6% *cox1* szekvencia különbséggel. Ez a szekvencia eltérés a nukleotid változatosság azon intervallumában (0,2-3%) van, ami a *R. sanguineus* (s.l.) esetében "fajon belül" jellemző (Dantas-Torres és mtsai, 2013). Ráadásul, a *R. leporis* és a *R. sanguineus* (s.l.) közötti – a *cox1* szekvenciában és filogenetikailag is észlelt – különbség már nem volt kimutatható a 16S rRNS génszakasz elemzésével (jóllehet ez utóbbi hosszúsága és így e vizsgálat érzékenysége elmarad a *cox1* génszakaszétól). Hasonlóképpen, Kuvaitból származó és morfológiailag *R. leporis* fajúként azonosított kullancsok 12S rRNS gén szekvenciája 99%-ban egyezett a *R. leporis* iraki, és a *R. sanguineus* (s.l.) dél-

amerikai mintáival (Zemtsova és mtsai, 2016). E rendszertani bizonytalanság alapján további és szélesebb körű vizsgálatokra lesz szükség annak eldöntéséhez, hogy a kelet- és nyugat-afrikai *R. leporis* nem a *R. sanguineus* (s.l.) vagy "trópusi" vonalon mint fajon belüli morfológiai változat-e.



4.8.5.6. ábra. A "*R. sanguineus*" és a *R. leporis* hímek diagnosztikailag fontos képletei: ([a] a *R. sp. I* baloldali légzőnyílás lemeze (Histria, Románia); [b] a *R. sp. II* adanalís lemeze (Pula, Horvátország); *R. leporis*: [c] a légzőnyílás lemezének hosszú, keskeny dorsalis nyúlványa van, és [d] könnyecsepp alakú, hátul lekerekedő adanalís lemezei).

Következésképpen, a *R. sanguineus* "mérsékelt égövi faján" belül létező két mitochondrialis vonal (vagyis a *Rhipicephalus* sp. I és II) földrajzi eloszlása eltér a Földközi-tenger medencéjében, ami a közöttük való korlátozott génáramlásra utal. Annak eldöntéséhez azonban, hogy ezek külön fajba tartoznak-e, több bizonyítékra lesz szükség (leginkább nukleáris genetikai markerek és morfológiai paraméterek széleskörű összehasonlításra, a reprodukciós kompatibilitás kérdésének tisztázására). Ugyanígy tovább kell vizsgálni a *R. leporis* rokonságába tartozó kelet- és nyugat-afrikai kullancsoknak a *R. sanguineus* (s.l.) vagy "trópusi" vonalhoz kapcsolódó filogenetikai viszonyait.

5. Új tudományos eredmények

A 4. fejezetben szereplő kutatások legfontosabb eredményeit a következőképpen foglalhatjuk össze:

1. A korábban egységesnek tartott hosszúlábú denevérkullancs-faj, az *Ixodes vespertilionis* önálló fajok komplexe. Közülük kettőt tudományra új fajként sikerült leírni: ezek az *I. ariadnae* és az *I. collaris*.
2. A *Pholeoixodes* alnem (ahová főleg búvóhelyként üreget használó emlősök és odúlakó vagy üregben költő madarak kullancsai tartoznak) magában foglalja a barlangi denevérek kullancsainak *Eschatocephalus* alnemét. A madarak *Ixodes frontalis* kullancsfaja és a denevérek *Argas vespertilionis* óvantag-faja filogenetikailag nem egységes. A *Haemaphysalis erinacei turanica* önálló faji státuszt érdemel. A *Babesia vesperuginis* nem a babesiákhoz (*sensu stricto*), hanem a prototheileridákhoz áll közel.
3. Hazánkban a *Dermacentor*- és a *Haemaphysalis*-fajok genuson belüli allokrónikus szezonalitást mutatnak. A jellemzően kora tavasszal gazdát kereső fajok aktivitási csúcsát a hirtelen emelkedő téli hőmérséklet akár 1-2 hónappal előrébb hozhatja, míg úgy tűnik, a folyamatosan enyhe tél kevésbé befolyásolja. A *Haemaphysalis inermis* növekvő jelentőségű faj.
4. Városi élőhelyeken a közepes illetve nagy testű kullancsgazda fajok előfordulásának függvényében változhat a kullancsok egyedsűrűsége, bennük a kórokozók gyakorisága. A városi élőhelyek "hőszigetként" előrehozhatják egyes "tavaszi kullancsfajok" aktivitását.
5. Városi élőhelyeken a *Babesia canis* tavasszal volt a leggyakoribb kullancs vektorában, a *Dermacentor reticulatus* fajban, mert úgy tűnik, befolyásolja e kullancsok aktivitását.
6. Egyes kullancs közvetítette kórokozók (*Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum*) alternatív potenciális vektorokban (bolhákban, atkákban) olyan helyeken és időben is előfordulhatnak, ahol és amikor ismert kullancs vektoraik nem (például épületen belül vagy télen, a városközpontban).
7. Az autópálya mint mesterséges barrier hatással van a kullancsok és az általuk közvetített kórokozók helyi előfordulására. Egy autópálya mentén, ahol különféle élőhelyeken (részben emiatt) a nagyvadak eltérő egyedsűrűséggel vannak jelen, az *Anaplasma phagocytophilum* és a *Borrelia burgdorferi* s.l. prevalenciája *Ixodes ricinus* nőtényekben fordítottan arányos lehet. Erdős, dús aljnövényzetű autópálya pihenőkben a Lyme-kór okozója akár jelentősen magasabb prevalenciával fordulhat elő, mint a környező területeken.
8. A madarak fertőződhetnek *Rickettsia helvetica* fajjal. A jellemzően föld felett táplálkozó madárfajokon a *Haemaphysalis concinna* gyakoribb kullancsfaj, mint az *Ixodes ricinus*. Hazánkba a vonuló madarak "egzotikus" kórokozókat hozhatnak be: nemcsak délről, de akár kelet felől is. A délről érkező madarak által behurcolt afrikai kullancsfaj, a *Hyalomma rufipes* hazánk kontinentális éghajlatán adulttá tud vedleni, így (kisebb populációkkal) képes lehet megtelepedni.
9. A denevérekben a kutya, a kerdődzők és az ember egyes piroplasmáinak, továbbá kutyákban a borz és a szarvasmarha néhány, kullancs közvetítette kórokozójának a DNS-e kimutatható.
10. Molekuláris bizonyítékok alapján a piroplasmák, a rickettsiák és az Anaplasmataceae család képviselői hazánkban sokkal nagyobb fajgazdagsággal fordulnak elő, mint korábban gondolták. A *Rickettsia africae* és egy *Babesia crassa* fajhoz közel álló piroplasma autochthon jelleggel előfordul Európában. A *Candidatus Rickettsia hungarica* tudományra új faj.
11. Mitochondriális markerek alapján a kullancsok, óvantagok fajain vagy fajcsoportjain belül genetikai heterogenitás (izoláció) fordulhat elő akár rövidebb földrajzi távolságban, ahol ez jégkorszaki refúgiumokhoz vagy geológiai barrierékhez (hegységekhez) köthető (például az *Ixodes vespertilionis* az Ibériai félsziget és Nyugat-Európa között, az *Argas vespertilionis* Közép-Ázsia és Délkelet-Ázsia között, a "*Rhipicephalus sanguineus*" a mediterrán térségben). Ugyanakkor fajon belüli genetikai homogenitás figyelhető meg akár nagyobb földrajzi távolságban is, ha ezek között a területek között – akár áttételesen, közös telelőterületekkel megvalósuló – madárvonulási kapcsolat van vagy azonos fajú denevérek átfedő populációi fordulnak elő (például a *Haemaphysalis concinna* Közép-Európa és a Távols-Kelet között, vagy az *Argas vespertilionis* Közép-Európa és Közép-Ázsia között).

6. A doktori mű alapjául szolgáló saját közlemények

(időrendben, [fejezet számmal])

Hornok S, Elek V, de la Fuente J, Naranjo V, Farkas R, Majoros G, Földvári G. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet Microbiol.* 2007;122:316-22. [4.7.1-2. fejezet]

Hornok S. Allochronic seasonal peak activities of *Dermacentor* and *Haemaphysalis* spp. under continental climate in Hungary. *Vet Parasitol.* 2009;163:366-9. [4.3.2. fejezet]

Hornok S, Farkas R. Influence of biotope on the distribution and peak activity of questing ixodid ticks in Hungary. *Med Vet Entomol.* 2009;23:41-6. [4.3.1. fejezet]

Hornok S, Meli ML, Perreten A, Farkas R, Willi B, Beugnet F, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Vet Microbiol.* 2010;140:98-104. [4.7.7. fejezet]

Hornok S, Horváth G. First report of adult *Hyalomma marginatum rufipes* (vector of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus) on cattle under a continental climate in Hungary. *Parasit Vectors.* 2012;5:170. [4.6.7. fejezet]

Hornok S, Kovács R, Meli ML, Gönczi E, Hofmann-Lehmann R, Kotschán J, Gyuranecz M, Dán A, Molnár V. First detection of bartonellae in a broad range of bat ectoparasites. *Vet Microbiol.* 2012;159:541-3. [4.4.2. fejezet]

Hornok S, Csörgő T, de la Fuente J, Gyuranecz M, Privigyei C, Meli ML, Kreizinger Z, Gönczi E, Fernández de Mera IG, Hofmann-Lehmann R. Synanthropic birds associated with high prevalence of tick-borne rickettsiae and with the first detection of *Rickettsia aeschlimannii* in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13:77-83. [4.7.9. fejezet]

Hornok S, Dénes B, Meli ML, Tánzos B, Fekete L, Gyuranecz M, de la Fuente J, de Mera IG, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. Non-pet dogs as sentinels and potential synanthropic reservoirs of tick-borne and zoonotic bacteria. *Vet Microbiol.* 2013;167:700-3. [4.7.11. fejezet]

Hornok S, de la Fuente J, Horváth G, Fernández de Mera IG, Wijnveld M, Tánzos B, Farkas R, Jongejan F. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia massiliae* in ixodid ticks of carnivores from South Hungary. *Acta Vet Hung.* 2013;61:42-50. [4.7.3. és 4.7.8. fejezet]

Hornok S, Meli ML, Gönczi E, Hofmann-Lehmann R. First evidence of *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in Hungary. *Parasit Vectors.* 2013;6:267. [4.7.6. fejezet]

Hornok S, Tánzos B, Fernández de Mera IG, de la Fuente J, Hofmann-Lehmann R, Farkas R. High prevalence of *Hepatozoon*-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol.* 2013;196:189-93. [4.7.18. fejezet]

Hornok S, Kotschán J, Kováts D, Kovács R, Angyal D, Görföl T, Polacsek Z, Kalmár Z, Mihalca AD. Bat ticks revisited: *Ixodes ariadnae* sp. nov. and allopatric genotypes of *I. vespertilionis* in caves of Hungary. *Parasit Vectors.* 2014;7:202. [4.1.1. és 4.3.5. fejezet]

Hornok S, Kováts D, Csörgő T, Meli ML, Gönczi E, Hadnagy Z, Takács N, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica*. *Parasit Vectors.* 2014;7:128. [4.5.1. fejezet]

Hornok S, Meli ML, Gönczi E, Halász E, Takács N, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. Occurrence of ticks and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* s.l. in three types of urban biotopes: forests, parks and cemeteries. Ticks Tick Borne Dis. 2014;5:785-9. [4.3.3. és 4.4.3. fejezet]

Hornok S, Mester A, Takács N, Fernández de Mera IG, de la Fuente J, Farkas R. Re-emergence of bovine piroplasmiasis in Hungary: has the etiological role of *Babesia divergens* been taken over by *B. major* and *Theileria buffeli*? Parasit Vectors. 2014;7:434. [4.7.15. és 4.7.17. fejezet]

Hornok S, Estók P, Kováts D, Flaisz B, Takács N, Szőke K, Krawczyk A, Kontschán J, Gyuranecz M, Fedák A, Farkas R, Haarsma AJ, Sprong H. Screening of bat faeces for arthropod-borne apicomplexan protozoa: *Babesia canis* and *Besnoitia besnoiti*-like sequences from Chiroptera. Parasit Vectors. 2015;8:441. [4.5.3. fejezet]

Hornok S, Estrada-Peña A, Kontschán J, Plantard O, Kunz B, Mihalca AD, Thabah A, Tomanović S, Burazerović J, Takács N, Görföl T, Estók P, Tu VT, Szőke K, Fernández de Mera IG, de la Fuente J, Takahashi M, Yamauchi T, Takano A. High degree of mitochondrial gene heterogeneity in the bat tick species *Ixodes vespertilionis*, *I. ariadnae* and *I. simplex* from Eurasia. Parasit Vectors. 2015;8:457. [4.8.1. fejezet]

Hornok S, Földvári G, Rigó K, Meli ML, Gönczi E, Répási A, Farkas R, Papp I, Kontschán J, Hofmann-Lehmann R. Synanthropic rodents and their ectoparasites as carriers of a novel haemoplasma and vector-borne, zoonotic pathogens indoors. Parasit Vectors. 2015;8:27. [4.4.1. fejezet]

Hornok S, Takács N, Kontschán J, György Z, Micsutka A, Icton S, Flaisz B, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. Diversity of *Haemaphysalis*-associated piroplasms of ruminants in Central-Eastern Europe, Hungary. Parasit Vectors. 2015;8:627. [4.7.13-14., 4.7.16. fejezet]

Hornok S, Takács N, Szőke K, Kunz B. First record of *Ixodes ariadnae* in Germany - Short communication. Acta Vet Hung. 2015;63:347-51. [4.6.1. fejezet]

Hornok S, Flaisz B, Takács N, Kontschán J, Csörgő T, Csipak Á, Jaksa BR, Kováts D. Bird ticks in Hungary reflect western, southern, eastern flyway connections and two genetic lineages of *Ixodes frontalis* and *Haemaphysalis concinna*. Parasit Vectors. 2016;9:101. [4.2.1. és 4.6.3. fejezet]

Hornok S, Görföl T, Estók P, Tu VT, Kontschán J. Description of a new tick species, *Ixodes collaris* n. sp. (Acari: Ixodidae), from bats (Chiroptera: Hipposideridae, Rhinolophidae) in Vietnam. Parasit Vectors. 2016;9:332. [4.1.2. fejezet]

Hornok S, Szőke K, Kováts D, Estók P, Görföl T, Boldogh SA, Takács N, Kontschán J, Földvári G, Barti L, Corduneanu A, Sándor AD. DNA of Piroplasms of Ruminants and Dogs in Ixodid Bat Ticks. PLoS One. 2016;11:e0167735. [4.5.2. fejezet]

Hornok S, Kartali K, Takács N, Hofmann-Lehmann R. Uneven seasonal distribution of *Babesia canis* and its two 18S rDNA genotypes in questing *Dermacentor reticulatus* ticks in urban habitats. Ticks Tick Borne Dis. 2016;7:694-697. [4.4.4. fejezet]

Hornok S, Krawczyk A. First record of *Ixodes ariadnae* in Western Europe, Belgium--Short communication. Acta Vet Hung. 2016;64:467-471. [4.6.2. fejezet]

Hornok S, Wang Y, Otranto D, Keskin A, Lia RP, Kontschán J, Takács N, Farkas R, Sándor AD. Phylogenetic analysis of *Haemaphysalis erinacei* Pavesi, 1884 (Acari: Ixodidae) from China, Turkey, Italy and Romania. Parasit Vectors. 2016;9:643. [4.2.3. és 4.6.5. fejezet]

Flaisz B, Sulyok KM, Kováts D, Kontschán J, Csörgő T, Csapak Á, Gyuranecz M, **Hornok S**. Babesia genotypes in *Haemaphysalis concinna* collected from birds in Hungary reflect phylogeographic connections with Siberia and the Far East. Ticks Tick Borne Dis. 2017;8:666-670. [4.8.4. fejezet]

Hornok S. *Ixodes ariadnae* Hornok, 2014. In: Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney TN (Eds): Ticks of Europe and North Africa: A guide to species identification. Springer International Publishing 2017, pp. 109-113. [4.1.1. fejezet]

Hornok S, Mulvihill M, Szőke K, Gönczi E, Sulyok KM, Gyuranecz M, Hofmann-Lehmann R. Impact of a freeway on the dispersal of ticks and *Ixodes ricinus*-borne pathogens: forested resting areas may become Lyme disease hotspots. Acta Vet Hung. 2017;65:242-252. [4.3.4. és 4.4.5. fejezet]

Hornok S, Sándor AD, Beck R, Farkas R, Beati L, Kontschán J, Takács N, Földvári G, Silaghi C, Meyer-Kayser E, Hodžić A, Tomanović S, Abdullah S, Wall R, Estrada-Peña A, Duscher GG, Plantard O. Contributions to the phylogeny of *Ixodes (Pholeoixodes) canisuga*, *I. (Ph.) kaiseri*, *I. (Ph.) hexagonus* and a simple pictorial key for the identification of their females. Parasit Vectors. 2017;10:545. [4.2.2. és 4.6.4. fejezet]

Hornok S, Sándor AD, Tomanović S, Beck R, D'Amico G, Kontschán J, Takács N, Görföl T, Bendjeddou ML, Földvári G, Farkas R. East and west separation of *Rhipicephalus sanguineus* mitochondrial lineages in the Mediterranean Basin. Parasit Vectors. 2017;10:39. [4.8.5. és 4.6.6. fejezet]

Hornok S, Szőke K, Görföl T, Földvári G, Tu VT, Takács N, Kontschán J, Sándor AD, Estók P, Epis S, Boldogh S, Kováts D, Wang Y. Molecular investigations of the bat tick *Argas vespertilionis* (Ixodida: Argasidae) and *Babesia vesperuginis* (Apicomplexa: Piroplasmida) reflect "bat connection" between Central Europe and Central Asia. Exp Appl Acarol. 2017;72:69-77. [4.8.3. fejezet]

Hornok S, Szőke K, Tu VT, Kontschán J, Takács N, Sándor AD, Halajian A, Földvári G, Estók P, Plantard O, Epis S, Görföl T. Mitochondrial gene heterogeneity of the bat soft tick *Argas vespertilionis* (Ixodida: Argasidae) in the Palearctic. Parasit Vectors. 2017;10:109. [4.8.2. fejezet]

Hornok S, Trauttwein K, Takács N, Hodžić A, Duscher GG, Kontschán J. Molecular analysis of *Ixodes rugicollis*, *Candidatus* Neoehrlichia sp. (FU98) and a novel *Babesia* genotype from a European badger (*Meles meles*). Ticks Tick Borne Dis. 2017;8:41-44. [4.7.5. fejezet]

Hornok S, Corduneanu A, Kontschán J, Bekő K, Szőke K, Görföl T, Gyuranecz M, Sándor AD. Analyses of separate and concatenated cox1 and 18S rRNA gene sequences indicate that the bat piroplasm *Babesia vesperuginis* is phylogenetically close to *Cytauxzoon felis* and the 'prototheilerid' *Babesia conradae*. Acta Vet Hung. 2018;66:107-115. [4.2.4. fejezet]

Hornok S, Horváth G, Takács N, Farkas R, Szőke K, Kontschán J. Molecular evidence of a badger-associated *Ehrlichia* sp., a *Candidatus* Neoehrlichia lotoris-like genotype and *Anaplasma marginale* in dogs. Ticks Tick Borne Dis. 2018;9:1302-1309. [4.5.5. és 4.7.4. fejezet]

Hornok S, Horváth G, Takács N, Kontschán J, Szőke K, Farkas R. Molecular identification of badger-associated *Babesia* sp. DNA in dogs: updated phylogeny of piroplasms infecting Caniformia. Parasit Vectors. 2018;11:235. [4.5.4. fejezet]

Hornok S, Murányi D, Kontschán J, Tu VT. Description of the male and the larva of *Ixodes collaris* Hornok, 2016 with drawings of all stages. Parasit Vectors. 2019; in press. [4.1.2. fejezet]

Hornok S, Szőke K, Meli ML, Sándor AD, Görföl T, Estók P, Wang Y, Tu VT, Kováts D, Boldogh SA, Corduneanu A, Sulyok KM, Gyuranecz M, Kontschán J, Takács N, Halajian A, Epis S, Hofmann-Lehmann R. Molecular detection of vector-borne bacteria in bat ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from eight countries of the Old and New Worlds. Parasit Vectors. 2019;12:50. [4.7.10. fejezet]

7. Irodalomjegyzék

(a 4. fejezetben az első szerző nevével és évszámmal hivatkozott közlemények)

- Adaszek L, Winiarczyk S. Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet Parasitol.* 2008;152:235–41.
- Aktas M. A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. *Vet Parasitol.* 2014;200:276–83.
- Alekseev AN, Dubinina HV. Enhancement of risk of tick-borne infection: environmental and parasitological aspects of the problem. *J Med Entomol.* 2008;45:812–5.
- Alvarado-Rybak M, Solano-Gallego L, Millán J. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasit Vectors.* 2016;9:538.
- Amusatogui I, Tesouro MA, Kakoma I, Sainz A. Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8:797–803.
- Apanaskevich DA, Bermúdez SE. Description of a new *Dermacentor* (Acari: Ixodidae) species, a parasite of wild mammals in Central America. *J Med Entomol.* 2013;50:1190–1201.
- Arnold J, Humer A, Heltai M, Murariu D, Spassov N, Hackländer K. Current status and distribution of golden jackals (*Canis aureus* L., 1758) in Europe. *Mammal Rev.* 2012;42:1–11.
- Arthur DR. The *Ixodes* ticks of Chiroptera (Ixodoidea, Ixodidae). *J Parasitol.* 1956;42:180–96.
- Ács Z, Kováts D. Phylogenetic patterns of a nightingale population in a contact zone of *Luscinia megarhynchos* and *L. luscinia* in Hungary. *North-West J Zool.* 2013;9:365–73.
- Babos S. Kullancsok – Ixodoidea. *Fauna Hungariae* 1965;18:1–38.
- Babos S, Janisch M. *Ixodes chiropterorum* sp. n., eine neue Zeckenart in Ungarn. – *Acta Vet Acad Sci Hung.* 1958;8:389–99.
- Balashov YS. Types of parasitism of acarines and insects on terrestrial vertebrates. *Entomol Rev.* 2006;86:957–71.
- Barandika JF, Espí A, Oporto B, del Cerro A, Barral M, Povedano I, García-Pérez AL, Hurtado A. Occurrence and genetic diversity of piroplasms and other Apicomplexa in wild carnivores. *Parasitology Open.* 2016;2:e6.
- Barros-Battesti DM, Ramirez DG, Landulfo GA, Faccini JHL, Dantas-Torres F, Labruna MB, Venzal JM, Onofrio VC. Immature argasid ticks: diagnosis and keys for Neotropical region. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013;22:443–56.
- Bazzocchi C, Mariconti M, Sasseria D, Rinaldi L, Martin E, Cringoli G, Urbanelli S, Genchi C, Bandi C, Epis S. Molecular and serological evidence for the circulation of the tick symbiont *Midichloria* (Rickettsiales: Midichloriaceae) in different mammalian species. *Parasit Vectors.* 2013;6:350.
- Beaucournu JC. On some palearctic Ixodoidea (Acarina) infesting micro-Chiroptera. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1966;41:495–502.
- Beck R, Vojta L, Mrljak V, Marinculić A, Beck A, Zivicnjak T, Cacciò SM. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int J Parasitol.* 2009;39:843–8.
- Beck A, Huber D, Polkinghorne A, Kurilj AG, Benko V, Mrljak V, Reljić S, Kusak J, Reil I, Beck R. The prevalence and impact of *Babesia canis* and *Theileria* sp. in free-ranging grey wolf (*Canis lupus*) populations in Croatia. *Parasit Vectors.* 2017;10:168.
- Belozеров VN. Diapause and biological rhythm in ticks. *Physiology of ticks* (ed. by F. D. Obenchain & R. Galun), Pergamon Press, Oxford, 1982, pp. 469–500.
- Bernasconi MV, Casati S, Peter O, Piffaretti JC. *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infect Genet Evol.* 2002;2:111–20.
- Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol.* 2008;22:1–15.
- Biocca E, Corradetti A. *Babesia missirolii*, n. sp., parassita del tasso (*Meles meles*). *Riv Parassitol.* 1952;13:17.
- Bogdanowicz W. *Myotis daubentonii*. *Mammal Spec.* 1994;475:1–9.
- Bown KJ, Bennet M, Begon M. Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:684–7.
- Bozeman FM, Shiral A, Humphries JW, Fuller HS. Ecology of Rocky Mountain spotted fever. II. Natural infection of wild mammals and birds in Virginia and Maryland. *Am J Trop Med Hyg.* 1967;16:48–59.
- Bray TC, Mohammed OB, Alagaili AN. Phylogenetic and Demographic Insights into Kuhl's Pipistrelle, *Pipistrellus kuhlii*, in the Middle East. *PLoS ONE* 2013;8:e57306.

- Brook CE, Dobson AP. Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* 2015;23:172-80.
- Burazerović J, Čakić S, Mihaljica D, Sukara R, Ćirović D, Tomanović S. Ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) parasitizing bats in the central Balkans. *Exp Appl Acarol.* 2015;66:281-91.
- Burg JG. Seasonal activity and spatial distribution of host-seeking adults of the tick *Dermacentor variabilis*. *Med Vet Entomol.* 2001;15:413-21.
- Burgdorfer W. Observations on *Rickettsia canada* a recently described member of the typhus group rickettsiae. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1968;12:26-31.
- Burgdorfer W, Aeschlimann A, Peter O, Hayes SF, Philip RN. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop* 1979;36:357-67.
- Burger TD, Shao R, Labruna MB, Barker SC. Molecular phylogeny of soft ticks (Ixodida: Argasidae) inferred from mitochondrial genome and nuclear rRNA sequences. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:195-207.
- Burgess EC, Wachal MD, Cleven TD. *Borrelia burgdorferi* infection in dairy cows, rodents, and birds from four Wisconsin dairy farms. *Vet Microbiol.* 1993;35:61-77.
- Burlini L, Teixeira KR, Szabó MP, Famadas KM. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? *Exp Appl Acarol.* 2010;50:361-74.
- Bush SE, Robbins RG. New host and locality records for *Ixodes simplex* Neumann and *Ixodes vespertilionis* Koch (Acari: Ixodidae) from bats (Chiroptera: Hipposideridae, Rhinolophidae and Vespertilionidae) in southern China. *Int J Acarol.* 2012;38:1-5.
- Buza L, Hajdu G, Temesi Z. Lóbabesios előfordulása hazánkban. *Magy Állatorvosok.* 1953;8:265-68.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:531-45.
- Camicas JL, Hervy JP, Adam F, Morel PC. Les tiques du monde. Nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition (Acarida, Ixodida). Orstom, 1998, Paris.
- Capek M, Literak I, Kocianova E, Sychra O, Najer T, Trnka A, Kverek P. Ticks of the *Hyalomma marginatum* complex transported by migratory birds into Central Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:489-93.
- Carcy B, Randazzo S, Depoix D, Adaszek L, Cardoso L, Baneth G, Gorenflot A, Schetters TP. Classification of *Babesia canis* strains in Europe based on polymorphism of the Bc28.1-gene from the *Babesia canis* Bc28 multigene family. *Vet Parasitol.* 2015;211:111-23.
- Casati S, Bernasconi MV, Gern L, Piffaretti JC. Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae). *Infect Genet Evol.* 2008, 8:152-8.
- Cavia R, Cueto GR, Suárez OV. Changes in rodent communities according to the landscape structure in an urban ecosystem. *Landsc. Urban Plan.* 2009;90:11-9.
- Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC, Koehler JE. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol.* 1996;34:1952-6.
- Coipan EC, Jahfari S, Fonville M, Maassen CB, van der Giessen J, Takken W, Takumi K, Sprong H. Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:36.
- Collar N. Common Blackbird (*Turdus merula*). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. & de Juana, E. (eds.) (2014). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Edicions, Barcelona. [hozzáférés: <http://www.hbw.com/node/58261> December 1, 2015]
- Concannon R, Wynn-Owen K, Simpson VR, Birtles RJ. Molecular characterization of haemoparasites infecting bats (Microchiroptera) in Cornwall, UK. *Parasitology* 2005;131:489-96.
- Conrad PA, Kjemtrup AM, Carreno RA, Thomford J, Wainwright K, Eberhard M, Quick R, Telford SR3rd, Herwaldt BL. Description of *Babesia duncani* n.sp. (Apicomplexa: Babesiidae) from humans and its differentiation from other piroplasmids. *Int J Parasitol.* 2006;36:779-89.
- Contini C, Palmas C, Seu V, Stancampiano L, Usai F. Redescription of the male of *Ixodes festai* Rondelli, 1926 (Ixodida: Ixodidae) on specimens from Sardinia (Italy). *Parasite.* 2011;18:235-40.
- Corduneanu A, Sándor AD, Mihalca AD, Hrazdilová K, Modry D, Hornok S: Molecular evidence of canine pathogens in tissues of European bats – Proceedings of the 17th International Bat Research Conference, 2016, Durban, South Africa, pp. 50-51. (hozzáférés: http://www.harrison-institute.org/IBRC_2016_Full_Program.pdf, november 16, 2016)
- Corduneanu A, Hrazdilová K, Sándor A D, Matei IA, Ionică AM, Barti L, Ciocănu MA, Măntoiu DS, Coroiu I, Hornok S, Fuehrer HP, Leitner N, Bagó Z, Stefke K, Modry D, Mihalca AD. *Babesia vesperuginis*, a neglected piroplasmid: new host and geographical records, and phylogenetic relations. *Parasit Vectors.* 2017;10:598.

- Cornely M, Schultz U. [The tick fauna of eastern Germany.] *Angew Parasitol.* 1992;33:173–83. [németül]
- Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis HJ, Lecuelle B, Lilin T, Vayssier-Taussat M. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1074–80.
- Criado-Fornelio A, Martínez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe - Part I. Epizootiological aspects. *Vet Parasitol.* 2003a;113:189–201.
- Criado-Fornelio A, Martínez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet Parasitol.* 2003b;114:173–94.
- Csikós K, Varga J, Hadházy Á, Bándy P. Kuttyák babesiosis: járványmentet és a klinikai kép változása Szekszárdon 1992 és 1999 között. *Magy Állatorvosok.* 2001;123:259–64.
- Csohány D. Sustainability report. Issued by the State Motorway Management Company, Ltd in 2011. (<http://kozadat.nemzetiutdij.hu/>, hozzáférés: október 11, 2016)
- Csörgő T, Karcza Z, Halmos G, Gyurác J, Magyar G, Szép T, Schmidt A, Bankovics A, Schmidt E: Magyar madárvonulási atlasz. Budapest: Kossuth Publishing Zrt, 2009, pp. 672.
- Dahmani M, Davoust B, Tahir D, Raoult D, Fenollar F, Mediannikov O. Molecular investigation and phylogeny of Anaplasmataceae species infecting domestic animals and ticks in Corsica, France. *Parasit Vectors.* 2017;10:302.
- Dankó Gy, Szilágyi M, Nádházy L. A szarvasmarhák anaplazmózisának hazai megállapítása. *Magy. Állatorvosok.* 1982;37:80–3.
- Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol.* 2008;152:173–85.
- Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors.* 2010;3:26.
- Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 2012;28:437–46.
- Dantas-Torres F, Latrofa MS, Annoscia G, Giannelli A, Parisi A, Otranto D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasit Vectors.* 2013;6:213.
- Dautel H, Kahl O. Ticks (Acari: Ixodidae) and their medical importance in the urban environment. In: Robinson WH, Rettich F, Rambo GW (eds.): Proceedings of the 3rd International Conference on Urban Pests 1999, pp 73–82.
- de La Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Höfle U, Fernández De Mera IG, Villanúa D, Almazán C, Torina A, Caracappa S, Kocan KM, Gortázar C. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2005;5:390–401.
- Dekker JJA, Regelink JR, Janssen EA, Brinkmann R, Limpens HJGA. Habitat use of female Geoffroy's bats (*Myotis emarginatus*) at it's two northernmost maternity roosts and the implications for their conservation. *Lutra* 2013;56:111–20.
- Derdáková M, Stefančíková A, Spitalská E, Tarageľová V, Košťálová T, Hrkľová G, Kybicová K, Schánilec P, Majláthová V, Várady M, Peňko B. Emergence and genetic variability of *Anaplasma* species in small ruminants and ticks from Central Europe. *Vet Microbiol.* 2011;153:293–8.
- Di Luca M, Toma L, Bianchi R, Quarchioni E, Marini L, Mancini F, Ciervo A, Khoury C. Seasonal dynamics of tick species in an urban park of Rome. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013;4:513–7.
- Dietz C, von Helversen O, Nill D. Bats of Britain, Europe and northwest Africa. A and C Black 2009, London, UK, 400 pp.
- Dietz C, Kiefer A. Bats of Britain and Europe. Bloomsbury Natural History, 2016, 400 pp.
- Diniz PP, Schulz BS, Hartmann K, Breitschwerdt EB. "Candidatus Neohelminthosiphium mikurensis" infection in a dog from Germany. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2059–62.
- Dobrynina DV, Kharitonov SP. The Russian waterbird migration atlas: temporal variation in migration routes. In: Boere GC, Galbraith CA, Stroud DA, editors. Waterbirds around the world. Edinburgh: The Stationary Office; 2006. p. 582–9.
- Dool SE, Puechmaile SJ, Dietz C, Juste J, Ibáñez C, Hulva P, Roué SG, Petit EJ, Jones G, Russo D, Toffoli R, Viglino A, Martinoli A, Rossiter SJ, Teeling EC. Phylogeography and postglacial recolonization of Europe by *Rhinolophus hipposideros*: evidence from multiple genetic markers. *Mol Ecol.* 2013;22:4055–70.
- Drovetski SV, Zink RM, Fadeev IV, Nesterov EV, Koblik EA, Red'kin YA, Rohwer S. Mitochondrial phylogeny of *Locustella* and related genera. *J Avian Biol.* 2004;35:105–10.

- Dubská L, Literák I, Kocianová E, Taragelová V, Sychra O. Differential role of passerine birds in distribution of *Borrelia* spirochetes, based on data from ticks collected from birds during the postbreeding migration period in Central Europe. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:596–602.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of Genera in the Families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales; Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*; Description of six New Species Combinations; and Designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as Subjective Synonyms of *Ehrlichia phagocytophilum*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:2145–65.
- Dumler JS. Clinical disease: current treatment and new challenges. In: Palmer GH, Azad AF (eds), *Intracellular pathogens II. Rickettsiales*. ASM Press, Washington, USA, 2012, pp 1–39.
- Durden LA, Hu R, Oliver JH Jr, Cilek JE. Rodent ectoparasites from two locations in northwestern Florida. *J Vector Ecol.* 2000;25:222–8.
- Estrada-Peña A. *Las garrapatas* (Acari: Ixodoidea) parásitas de *murciélagos* (Mammalia, Chiroptera). (II). *Rev Ibér Parasitol.* 1989;49:165–75.
- Estrada-Peña A, Osacar JJ, Gortazar C, Calvete C, Lucientes, J. An account of the ticks of northeastern Spain (Acarina: Ixodidae). *Annal Parasitol Hum Comp.* 1992;67:42–9.
- Estrada-Peña A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp Appl Acarol.* 1999;23:685–715.
- Estrada-Peña A, Nava S, Petney T. Description of all the stages of *Ixodes inopinatus* n. sp. (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:734–43.
- EUROBATS. Report on the implementation of 'Eurobats' in Hungary. *National report 2010*, 6:22. http://www.eurobats.org/sites/default/files/documents/pdf/National_Reports/nat_rep_Hun_2010.pdf [hozzáférés: március 3, 2015]
- Fain A., Roggeman W., Symens P., Al Suhaibani A. Notes on a small collection of immature *Hyalomma* ticks from migrating birds during their Spring migration in Karan Island, Persian Gulf, Saudi Arabia. *Bull Inst Roy Sci Natur Belg Entomol.* 1995;65:101–3.
- Fajs L, Durmišič E, Knap N, Strle F, Avšič-Županc T. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. *PLoS ONE* 2012;7:e48420.
- Fankhauser B, Irwin JP, Stone ML, Chester S, Soll MD. Repellent and insecticidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Parasit Vectors.* 2015;8:61.
- Farkas R, Estrada-Peña A, Jaenson TGT, Pascucci I, Madder M. Basic biology and geographical distribution of tick species involved in the transmission of animal pathogens, including zoonoses. In: Salman M, Tarres-Call J (eds). *TICKS AND TICK-BORNE DISEASES: Geographical distribution and control strategies in the Euro-Asia region*. Published by CABI (CAB international), 2003, Wallingford, UK, pp. 6–26.
- Feider Z. Ixodoidea. In: *Fauna of the Popular Republic of Romania*. 1965, volume 5/2. Published by Academiei Republicii Populare Romane, Bucuresti. [románul]
- Fernández-Soto P, Encinas-Grandes A, Pérez-Sánchez R. *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: Molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:889–90.
- Filippova NA. Ixodid Ticks of the Subfamily Ixodinae. In: *Fauna of the USSR. Arachnidea*. 1977; Vol. 4. Nauka, Leningrad, pp. 252–60. [oroszul]
- Filippova NA, Uspenskaya IG. *Ixodes kaiseri* Arthur 1957 (Ixodidae) species taxonomic status. *Parazitologiya* 1973;7:297–306. [oroszul]
- Filippova NA, Neronov V M, Farhang-Azad A. Data on the ixodid fauna (Acarina, Ixodidae) of small mammals in Iran. *Entomol Obozrenie.* 1976;55:467–79. [oroszul]
- Filipova NA, Panova IV, Musatov SA. The taxonomic pattern of the polytypic species *Haemaphysalis erinacei* (Ixodidae). *Parazitologiya (Stsburg)* 1993;27: 193–215. [oroszul]
- Flanders J, Jones G, Benda P, Dietz C, Zhang S, Li G, Sharifi M, Rossiter SJ. Phylogeography of the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*: contrasting results from mitochondrial and microsatellite data. *Mol Ecol.* 2009;18:306–18.
- Foley J, Drazenovich N, Leutenegger CM, Chomel BB. Association between polyarthritis and thrombocytopenia and increased prevalence of vectorborne pathogens in Californian dogs. *Vet Rec.* 2007;160:159–62.
- Fourie LJ, Belozero VN, Kok DJ. Sex ratio characteristics in *Ixodes rubicundus* (Acari: Ixodidae), the Karoo paralysis tick. *Exp Appl Acarol.* 1996;20:477–81.
- Fournier PE, El Karkouri K, Leroy Q, Robert C, Giumelli B, Renesto P, Socolovschi C, Parola P, Audic S, Raoult D. Analysis of the *Rickettsia africae* genome reveals that virulence acquisition in Rickettsia species may be explained by genome reduction. *BMC Genomics.* 2009;10:166.

- Földvári G, Farkas R. Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. *Vet Parasitol.* 2005;129:125–131.
- Földvári G, Rigó K, Jablonszky M, Biró N, Majoros G, Molnár V, Tóth M. Ticks and the city: ectoparasites of the Northern white-breasted hedgehog (*Erinaceus roumanicus*) in an urban park. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011;2:231–4.
- Frank R, Kuhn T, Werblow A, Liston A, Kochmann J, Klimpel S. Parasite diversity of European *Myotis* species with special emphasis on *Myotis myotis* (Microchiroptera, Vespertilionidae) from a typical nursery roost. *Parasit Vectors.* 2015;8:101.
- Franke J, Fritzsche J, Tomaso H, Straube E, Dorn W, Hildebrandt A. Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:6829–36.
- Friedhoff, KT. Transmission of *Babesia*: Other means of transmission. In: Ristic M (ed.): Babesiosis of domestic animals and man. CRC Press, Boca Raton, Florida; 1988. p. 45.
- Fujisaki K, Kawazu S, Kamio T. The taxonomy of the bovine *Theileria* spp. *Parasitol Today.* 1994;10:31–3.
- García-Pérez AL, Oporto B, Espí A, del Cerro A, Barral M, Povedano I, Barandika JF, Hurtado A. Anaplasmataceae in wild ungulates and carnivores in northern Spain. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:264–9.
- Gardner RA, Molyneux DH. *Babesia vesperuginis*: natural and experimental infections in British bats Microchiroptera. *Parasitology* 1987;95:461–9.
- Gardner RA, Molyneux DH, Stebbings RE. Studies on the prevalence of haematozoa of British bats. *Mammal Review.* 1987;17:75–80.
- Genchi C, Manfredi MT. Tick species infesting ruminants in Italy: ecological and bio-climatic factors affecting the different regional distribution. *Parassitol Roma.* 1999;41(Suppl. 1):41–5.
- Giangaspero A, Marangi M, Papini R, Paoletti B, Wijnveld M, Jongejan F. *Theileria* sp. OT3 and other tick-borne pathogens in sheep and ticks in Italy: molecular characterization and phylogeny. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6:75–83.
- Gilot B, Pérez-Eid C. Bioecology of ticks causing the most important pathology in France. *Méd Malad Infect.* 1998;28:325–34.
- Gimenez C, Casado N, Criado-Fornelio A, de Miguel FA, Dominguez-Peñañiel G. A molecular survey of Piroplasmida and *Hepatozoon* isolated from domestic and wild animals in Burgos (northern Spain). *Vet Parasitol.* 2009;162:147–50.
- Glenn BL, Rolley RE, Kocan AA. *Cytauxzoon-like* piroplasms in erythrocytes of wild-trapped bobcats in Oklahoma. *J Am Vet Med Assoc.* 1982;181:1251–3.
- Gou H, Guan G, Liu A, Ma M, Xu Z, Liu Z, Ren Q, Li Y, Yang J, Chen Z, Yin H, Luo J. A DNA barcode for Piroplasma. *Acta Tropica.* 2012;124:92–7.
- Gou H, Guan G, Liu A, Ma M, Chen Z, Liu Z, Ren Q, Li Y, Yang J, Yin H, Luo J. Coevolutionary analyses of the relationships between piroplasmids and their hard tick hosts. *Ecol Evol.* 2013;3:2985–93.
- Graham RI, Mainwaring MC, Du Feu R. Detection of spotted fever group *Rickettsia* spp. from bird ticks in the U.K. *Med Vet Entomol.* 2010;24:340–3.
- Gray JS. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev Med Vet Entomol.* 1991;79:323–33.
- Gray JS, Kirstein F, Robertson JN, Stein J, Kahl O. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Exp Appl Acarol.* 1999;23:717–29.
- Gubbels MJ, Hong Y, van der Weide M, Qi B, Nijman IJ, Guangyuan L, Jongejan F. Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *Int J Parasitol* 2000;30:943–52.
- Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG, Shao R, Barker SC. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2010;2528:1–28.
- Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG. The hard ticks of the world. Springer (Dordrecht, The Netherlands), 2014, pp. 738.
- Hammer JF, Jenkins C, Bogema D, Emery D. Mechanical transfer of *Theileria orientalis*: possible roles of biting arthropods, colostrum and husbandry practices in disease transmission. *Parasit Vectors.* 2016;9:34.
- Hamšíková Z, Kazimírová M, Haruštiaková D, Mahríková L, Slovák M, Berthová L, Kocianová E, Schnittger L. *Babesia* spp. in ticks and wildlife in different habitat types of Slovakia. *Parasit Vectors.* 2016;9:292.
- Harrus S, Bar-Gal GK, Golan A, Elazari-Volcani R, Kosoy MY, Morick D, Avidor B, Baneth G. Isolation and genetic characterization of a *Bartonella* strain closely related to *Bartonella tribocorum* and *Bartonella elizabethae* in Israeli commensal rats. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:55–8.
- Hartelt K, Pluta S, Oehme R, Kimmig P. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. *Parasitol Res.* 2008;103(Suppl. 1):S109–S116.

- Hashemi-Fesharki R, Uilenberg G. *Babesia crassa* n.sp. (Sporozoa, Babesiidae) of domestic sheep in Iran. *Vet Q.* 1981;3:1–8.
- Hasle G, Bjune G, Edvardsen E, Jakobsen C, Linnehol B, Røer JE, Mehl R, Røed KH, Pedersen J, Leinaas HP. Transport of ticks by migratory passerine birds to Norway. *J Parasitol.* 2009;95:1342–51.
- Hasle G. Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:48.
- Hewitt GM. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J Linnean Soc.* 1999;68:87–112.
- Hillyard PD. Ticks of North-West Europe: Keys and notes for identification of the species. *Synopses of the British Fauna (New Series) (52)*, Field Studies Council, Shrewsbury, UK; 1996. 178 pp .
- Hock RJ. The metabolic rates and body temperatures of bats. *Biol Bull.* 1951;101:289–99.
- Hodžić A, Cézanne R, Duscher GG, Harl J, Glawischnig W, Fuehrer HP. *Candidatus* Neoehrlichia sp. in an Austrian fox is distinct from *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, but closer related to *Candidatus* Neoehrlichia lotoris. *Parasit Vectors* 2015;8:539.
- Hodžić A, Mitková B, Modrý D, Juránková J, Frgelečová L, Forejtek P, Steinbauer V, Duscher GG. A new case of the enigmatic *Candidatus* Neoehrlichia sp. (FU98) in a fox from the Czech Republic. *Mol Cell Probes* 2016;31:59–60.
- Hofmann-Lehmann R, Wagmann N, Meli ML, Riond B, Novacco M, Joekel D, Gentilini F, Marsilio F, Pennisi MG, Lloret A, Carrapiço T, Boretti FS. Detection of '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' and other Anaplasmataceae and Rickettsiaceae in Canidae in Switzerland and Mediterranean countries. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2016;158:691–700.
- Holišová V. Vertical movements of some small mammals in a forest. *Zool Listy.* 1969;18: 121–141.
- Hoogstraal H. *Argas vespertilionis*. In: African Ixodoidea I. Ticks of the Sudan. Department of the Navy, Bureau of Medicine and Surgery, Washington DC, 1956, pp.104–111.
- Hoogstraal H. Bat ticks of the genus *Argas* (Ixodoidea, Argasidae). 3. The subgenus *Carios*. A redescription of *A. (C.) vespertilionis* (Latreille, 1802), and variation within an Egyptian population. *Ann Ent Soc Am.* 1958;51:19–26.
- Hoogstraal H. Biological observations on certain Turkish *Haemaphysalis* ticks (Ixodoidea, Ixodidae). *J Parasitol.* 1959;45:227–32.
- Hoogstraal H. Studies on Southeast Asian *Haemaphysalis* ticks (Ixodoidea, Ixodidae). Redescription, hosts, and distribution of *H. traguli* Oudemans. The larva and nymph of *H. vidua* W. and N. Identity of *H. papuana toxopei* Warburton (n. comb.). *J Parasitol.* 1964;50:765–82.
- Hoogstraal H. *Haemaphysalis (Alloceraea) kitaokai* sp. n. of Japan, and keys to species in the structurally primitive subgenus *Alloceraea* Schulze of Eurasia (Ixodoidea, Ixodidae). *J Parasitol.* 1969;55:211–21.
- Hoogstraal H, Kaiser MN. Observation on Egyptian *Hyalomma* ticks (Ixodoidea, Ixodidae). 2. Parasitism of migrating birds by immature *H. rufipes* Koch. *Ann Entomol Soc Am.* 1958;51: 12–16.
- Hope PR, Bohmann K, Gilbert MT, Zepeda-Mendoza ML, Razgour O, Jones G. Second generation sequencing and morphological faecal analysis reveal unexpected foraging behaviour by *Myotis nattereri* (Chiroptera, Vespertilionidae) in winter. *Front Zool.* 2014;11:39.
- Hornok S. *Ixodes vespertilionis* Koch, 1844. In: Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney TN (Eds): Ticks of Europe and North Africa: A guide to species identification. Springer International Publishing 2017a, pp. 97-101.
- Hornok S. *Ixodes simplex* Neumann, 1906. In: Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney TN (Eds): Ticks of Europe and North Africa: A guide to species identification. Springer International Publishing 2017b, pp. 103-7.
- Hornok S. *Ixodes ariadnae* Hornok, 2014. In: Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney TN (Eds): Ticks of Europe and North Africa: A guide to species identification. Springer International Publishing 2017c, pp. 109-13.
- Hornok S, Farkas R. Kuttyák első autochton *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fertőzőtsége Magyarországon: esetleírás és az e kullancsfajjal kapcsolatos ismeretek áttekintése. *Magy Állatorvosok.* 2005;127:623–9.
- Hornok S, Edelhofer R, Farkas R. Seroprevalence of canine babesiosis in Hungary suggesting breed predisposition. *Parasitol Res.* 2006;99:638–42.
- Hornok S, Elek V, de la Fuente J, Naranjo V, Farkas R, Majoros G, Földvári G. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet Microbiol.* 2007a;122:316–322.
- Hornok S, Edelhofer R, Földvári G, Joachim A, Farkas R. Serological evidence for *Babesia canis* infection of horses and an endemic focus of *B. caballi* in Hungary. *Acta Vet Hung.* 2007b;55: 491–500.
- Hornok S, Hofmann-Lehmann R, Fernández de Mera IG, Meli ML, Elek V, Hajtós I, Répási A, Gönczi E, Tánczos B, Farkas R, Lutz H, de la Fuente J. Survey on blood-sucking lice (Phthiraptera: Anoplura) of ruminants and pigs with molecular detection of *Anaplasma* and *Rickettsia* spp. *Vet Parasitol.* 2010;174:335–8.

- Hornok S, Kovács R, Meli ML, Kontschán J, Gönczi E, Gyuranecz M, Dán Á, Molnár V, Hofmann-Lehmann R. First detection of bartonellae in a broad range of bat ectoparasites. *Vet Microbiol.* 2012a;159:541–3.
- Hornok S, Horváth G, Jongejan F, Farkas R. Ixodid ticks on ruminants, with on-host initiated moulting (apolysis) of *Ixodes*, *Haemaphysalis* and *Dermacentor* larvae. *Vet Parasitol.* 2012b;187:350–3.
- Hornok S, Karcza Zs, Csörgő T. Birds as disseminators of ixodid ticks and tick-borne pathogens: note on the relevance to migratory routes. *Ornis Hung.* 2012c;20:86–9.
- Hornok S Micsutka A, Fernández de Mera IG, Meli ML, Gönczi E, Tánczos B, Mangold AJ, Farkas R, Lutz H, Hofmann-Lehmann R, de la Fuente J. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Res Vet Sci.* 2012d;92:30–35.
- Hornok S, Csörgő T, de la Fuente J, Gyuranecz M, Privigyei C, Meli ML, Kreizinger Z, Gönczi E, Fernández de Mera IG, Hofmann-Lehmann R. Synanthropic birds associated with high prevalence of tick-borne rickettsiae and with the first detection of *Rickettsia aeschlimannii* in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013a;13:77–83.
- Hornok S, Dénes B, Meli ML, Tánczos B, Fekete L, Gyuranecz M, de la Fuente J, de Mera IG, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. Non-pet dogs as sentinels and potential synanthropic reservoirs of tick-borne and zoonotic bacteria. *Vet Microbiol.* 2013b;167:700–3.
- Hornok S, Kontschán J, Estrada-Peña A, de Mera IG, Tomanović S, de la Fuente J. Contributions to the morphology and phylogeny of the newly discovered bat tick species, *Ixodes ariadnae* in comparison with *I. vespertilionis* and *I. simplex*. *Parasit Vectors.* 2015a;8:47.
- Hornok S, Takács N, Kontschán J, György Z, Micsutka A, Icteton S, Flaisz B, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. Diversity of *Haemaphysalis*-associated piroplasms of ruminants in Central-Eastern Europe, Hungary. *Parasit Vectors.* 2015b;8:627.
- Hornok S, Ágh N, Takács N, Kontschán J, Hofmann-Lehmann R. *Haematospirillum* and insect *Wolbachia* DNA in avian blood. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2018;111:479–83.
- Hutson AM, Aulagnier S, Benda P, Karataş A, Palmeirim J, Paunović M. *Miniopterus schreibersii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T13561A4160556.
- Hutterer R, Ivanova T, Meyer-Cords C, Rodrigues L. Bat Migrations in Europe. A Review of Banding Data and Literature. *Naturschutz und Biologische Vielfalt* 28. Federal Agency for Nature Conservation, 2005, Bonn.
- Huysse T, Poulin R, Théron A. Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends Parasitol.* 2005;1:469–75.
- Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishi T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Vet Parasitol.* 2002;106:265–71.
- Ioannou I, Chochlakis D, Kasinis N, Anayiotos P, Lyssandrou A, Papadopoulos B, Tselentis Y, Psaroulaki A. Carriage of *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(Suppl 2):158–60.
- Irwin DE, Irwin JH. Siberian migratory divides: the role of seasonal migration in speciation. In: Greenberg R, Marra PP, eds. *Birds of two worlds: the ecology and evolution of migratory birds*. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, 2005, pp. 27–40.
- Irwin DE, Rubtsov AS, Panov EN. Mitochondrial introgression and replacement between Yellowhammers (*Emberiza citrinella*) and Pine Buntings (*Emberiza leucocephalos*) (Aves: Passeriformes), *Biol J Linn Soc.* 2009;98:422–38.
- Ishiguro F, Takada N, Masuzawa T, Fukui T. Prevalence of Lyme disease *Borrelia* spp. in ticks from migratory birds on the Japanese mainland. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:982–6.
- Izzo MM, Poe I, Horadagoda NJdVA, House JK. Haemolytic anaemia in cattle in NSW associated with *Theileria* infections. *Aust Vet J.* 2010;88:45–51.
- Jaenson TG, Tälleklint L. Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme borreliosis spirochete. *J Med Entomol.* 1992;29:813–7.
- Jaenson TGT, Tälleklint L, Lundqvist L, Olsén B, Chirico J, Mejlon H. Geographical distribution, host associations and vector roles of ticks (Acari: Ixodidae and Argasidae) in Sweden. *J Med Entomol.* 1994;31:240–56.
- Jahfari S, Fonville M, Hengeveld P, Reusken C, Scholte EJ, Takken W, Heyman P, Medlock J, Heylen D, Kleve J, Sprong H. Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasit Vectors* 2012;5:74.
- Jahfari S, Coipan EC, Fonville M, van Leeuwen AD, Hengeveld P, Heylen D, Heyman P, van Maanen C, Butler CM, Földvári G, Szekeres S, van Duijvendijk G, Tack W, Rijks JM, van der Giessen J, Takken W, van Wieren SE, Takumi K, Sprong H. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors.* 2014;7:365.

- Jameson LJ, Morgan PJ, Medlock JM, Watola G, Vaux AG. Importation of *Hyalomma marginatum*, vector of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, into the United Kingdom by migratory birds. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3:95–9.
- Janisch M. A hazai kullancsfauna feltérképezése. *Állatt Közl.* 1959;47:103–10.
- Jefferies R, Ryan UM, Jardine J, Broughton DK, Robertson ID, Irwin PJ. Blood, bull terriers and babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Aust Vet J.* 2007;85:459–63.
- Jinnai M, Kawabuchi-Kurata T, Tsuji M, Nakajima R, Fujisawa K, Nagata S, Koide H, Matoba Y, Asakawa M, Takahashi K, Ishihara C. Molecular evidence for the presence of new *Babesia* species in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Hokkaido, Japan. *Vet Parasitol.* 2009;162:241–7.
- Jinnai M, Kawabuchi-Kurata T, Tsuji M, Nakajima R, Hirata H, Fujisawa K, Shiraki H, Asakawa M, Nasuno T, Ishihara C. Molecular evidence of the multiple genotype infection of a wild Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) by *Babesia* sp. UR1. *Vet Parasitol.* 2010;173:128–33.
- Jones EK, Clifford CM. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). V. A revised key to larval Argasidae of the western hemisphere and description of seven new species of *Ornithodoros*. *Ann Ent Soc Am.* 1972;65:730–40.
- Kantsø B, Svendsen CB, Jensen PM, Vennestrøm J, Kroghfelt KA. Seasonal and habitat variation in the prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks from Denmark. *Ticks Tick Borne Dis.* 2010;1:101–103.
- Kamau J, de Vos AJ, Playford M, Salim B, Kinyanjui P, Sugimoto C. Emergence of new types of *Theileria orientalis* in Australian cattle and possible cause of theileriosis outbreaks. *Parasit Vectors.* 2011;4:22.
- Kampen H. [Do we have to expect a spreading of vector-borne diseases in Europe?] *Mitt Deut Gesellsch Entomol.* 2001;13:551–556. [németül]
- Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, Hudson P, Jolles A, Jones KE, Mitchell CE, Myers SS, Bogich T, Ostfeld RS. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 2010;468:647–52.
- Keesing F, Hersh MH, Tibbetts M, McHenry DJ, Duerr S, Brunner J, Killilea M, LoGiudice K, Schmidt KA, Ostfeld RS. Reservoir competence of vertebrate hosts for *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:2013–6.
- Kelly PJ, Matthewman LA, Mason PR, Courtney S, Katsande C, Rukwava J. Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*. *J Trop Med Hyg.* 1992;95:322–6.
- Kervyn T, Godin MC, Jocque R, Grootaert P, Libois R. Web-building spiders and stable flies as prey of the notch-eared bat (*Myotis emarginatus*). *Belg J Zool.* 2012;142:59–67.
- Khasnatinov MA, Liapunov AV, Manzarova EL, Kulakova NV, Petrova IV, Danchinova GA. The diversity and prevalence of hard ticks attacking human hosts in Eastern Siberia (Russian Federation) with first description of invasion of non-endemic tick species. *Parasitol Res.* 2016;115:501–10.
- Kiszewski AE, Matuschka F-R, Spielman A. Mating strategies and spermiogenesis in ixodid ticks. *Annu Rev Entomol.* 2001;46:167–82.
- Kjemtrup AM, Kocan AA, Whitworth L, Meinkoth J, Birkenheuer AJ, Cummings J, Boudreaux MK, Stockham SL, Irizarry-Rovira A, Conrad PA. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *Int J Parasitol.* 2000;30:1501–5.
- Kjemtrup AM, Wainwright K, Miller M, Penzhorn BL, Carreno RA. *Babesia conradae*, sp. nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Vet Parasitol.* 2006;138:103–111.
- Klimpel S, Mehlhorn H. Bats (Chiroptera) as vectors of diseases and parasites: facts and myths. *Springer Publ.* 2014. New York, pp 187.
- Klomp JSH, Oliver JH. Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae). *Syst Entomol.* 1993;18:313–31.
- Kotlán S. Adatok a hazai kullancs-fauna ismeretéhez. *Állatt Közl.* 1919;18:33.
- Kotlán A, Versényi L, Janisch M. Über das Vorkommen von *Piroplasma bigeminum* in Ungarn. *Acta Vet Acad Sci Hung.* 1959;9:131–3.
- Kotlík P, Deffontaine V, Mascheretti S, Zima J, Michaux JR, Searle JB. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:14860–4.
- Korotkov IuS. Methods for estimating the demographic structure of the taiga tick (Ixodidae) based on results of standard parasitological observations. *Parazitologija* 2004;38:492–502. [oroszul]
- Kovalev SY, Mukhacheva TA. Phylogeographical structure of the tick *Ixodes persulcatus*: a novel view. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3:212–8.

- Kováts D, Csanádi D, Kukoda O, Kurali A, Újhegyi N. Nursing colonies of the mouse-eared bat (*Myotis myotis* Borkhausen, 1797) and the lesser mouse-eared bat (*M. blythii* Tomes, 1857) in underground roosts of the Gerecse and the Visegrádi Mts. International Conference of cave-dwelling bats; SPELEOBATS Hungary, 21-23 September, 2012, Miskolc).
- Kováts D, Kurali A, Wizl V, Kukoda O. [First results of the bat research programme in the Danube band]. - In: Gyenis Gy, Surányi D, Penszka K, Urbányi B (eds.): Proceedings of the 7th Biological Symposium of the Carpathian Basin (October 13-14, 2011, Budapest), pp. 123–6.
- Krakowetz CN, Lindsay LR, Chilton NB. Genetic variation in the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). Parasit Vectors. 2014;7:530.
- Kruskop VS, Borisenko VA, Ivanova VN, Lim KB, Eger LJ. Genetic diversity of northeastern Palaearctic bats as revealed by DNA barcodes. Acta Chiropterol. 2012;14:1–14.
- Kuttler KL. Canine babesiosis. In: Ristic M (ed.): Babesiosis of domestic animals and man. CRC Press, Boca Raton, Florida; 1988. pp. 12–13.
- Lack JB, Reichard MV, Van Den Bussche RA. Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. Int J Parasitol. 2012;42:353–63.
- Lebedeva NN, Korenberg EI. Distribution of *Haemaphysalis concinna* Koch in the Soviet Union and some general features of its ecology. Folia Parasitol. 1981;28:249–61.
- Leclaire S, Menard S, Berry A. Molecular characterization of *Babesia* and *Cytauxzoon* species in wild South African meerkats. Parasitology. 2015;142:543–8.
- Leschnik M, Kirtz G, Tichy A, Leidinger E. Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. Int J Med Microbiol. 2008;298(Suppl):243–48.
- Levin ML, Studer E, Killmaster L, Zemtsova G, Mumcuoglu KY. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Exp Appl Acarol. 2012;58:51–68.
- Li G, Liang B, Wang Y, Zhao H, Helgen KM, Lin L, Jones G, Zhang S. Echolocation calls, diet, and phylogenetic relationships of Stoliczka's trident bat, *Aselliscus stoliczkanus* (Hipposideridae). J Mammal. 2007;88:736–44.
- Li S, Sun K, Lu G, Lin A, Jiang T, Jin L, Hoyt JR, Feng J. Mitochondrial genetic differentiation and morphological difference of *Miniopterus fuliginosus* and *Miniopterus magnater* in China and Vietnam. Ecol Evol. 2015;5:1214–23.
- Li Z-l, Xio B-l. Observations on the breeding and biological characteristics of *Leptopsylla segnis*. Endem Dis Bull. 1993;8:26-8.
- Liebisch A, Rahman MS. Prevalence of the ticks *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) and *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) and their importance as vectors of diseases in Germany (author's transl)]. Tropenmed Parasitol. 1976;27:393–404. [németül]
- Lin JW, Hsu YM, Chomel BB, Lin LK, Pei JC, Wu SH, Chang CC. Identification of novel *Bartonella* spp. in bats and evidence of Asian gray shrew as a new potential reservoir of *Bartonella*. Vet Microbiol. 2012;156:119–26.
- Lindstrom A, Jaenson TGT. Distribution of the common tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in different vegetation types in Southern Sweden. J Med Entomol. 2003;40:375–8.
- Liu GH, Chen F, Chen YZ, Song HQ, Lin RQ, Zhou DH, Zhu XQ. Complete mitochondrial genome sequence data provides genetic evidence that the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) represents a species complex. Int J Biol Sci. 2007;9:361–9.
- Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, Ndjanga JB, Sanz CM, Morgan DB, Locatelli S, Gonder MK, Kranzusch PJ, Walsh PD, Delaporte E, Mpoudi-Ngole E, Georgiev AV, Muller MN, Shaw GM, Peeters M, Sharp PM, Rayner JC, Hahn BH. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. Nature 2010;467:420–5.
- Lloyd, JE. Louse flies, keds, and related flies (Hippoboscoidea). In: Mullen LA. and Durden GR. (eds.) Medical and Veterinary Entomology. Academic Press, Amsterdam, 2002, pp. 349-62.
- Loftis AD, Reeves WK, Szumlas DE, Abbassy MM, Helmy IM, Moriarity JR, Dasch GA. Surveillance of Egyptian fleas for agents of public health significance: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, and *Yersinia pestis*. Am J Trop Med Hyg. 2006;75:41–8.
- Lommano E, Dvořák C, Vallotton L, Jenni L, Gern L. Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. Ticks Tick Borne Dis. 2014;5:871–82.
- Lourenco S. Ecology of a host-parasite system. A study in temperate cave dwelling bats. PhD Thesis, University of Lisboa, Portugal. 2008.

- Lu X, Lin XD, Wang JB, Qin XC, Tian JH, Guo WP, Fan FN, Shao R, Xu J, Zhang YZ. Molecular survey of hard ticks in endemic areas of tick-borne diseases in China. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013;4:288–96.
- Lussenhop J. Urban cemeteries as bird refuges. *The Condor* 1977;79:456–61.
- Lv J, Wu S, Zhang Y, Chen Y, Feng C, Yuan X, Jia G, Deng J, Wang C, Wang Q, Mei L, Lin X: Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasit Vectors.* 2014;7:93.
- Lv J, Fernández de Marco MDM, Goharriz H, Phipps LP, McElhinney LM, Hernández-Triana LM, Wu S, Lin X, Fooks AR, Johnson N. Detection of tick-borne bacteria and babesia with zoonotic potential in *Argas (Carios) vespertilionis* (Latreille, 1802) ticks from British bats. *Sci Rep.* 2018;8:1865.
- Malagon F, Tapia JL. Experimental transmission of *Babesia microti* infection by the oral route. *Parasitol Res.* 1994;80:645-8.
- Mannelli A, Tolari F, Pedri P, Stefanelli S. Spatial distribution and seasonality of ticks (Acarina: Ixodidae) in a protected area in the northern Apennines. *Parassitol Roma.* 1997;39:41–5.
- Masuzawa T, Hashimoto N, Kudeken M, Kadosaka T, Nakamura M, Kawabata H, Koizumi N, Imai Y. New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 5):421–6.
- Materna J, Daniel M, Danielová V. Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in Central Europe: results of 3-year monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). *Central Eur J Pub Health.* 2005;13:24–8.
- Maurer FP, Keller PM, Beuret C, Joha C, Achermann Y, Gubler J, Bircher D, Karrer U, Fehr J, Zimmerli L, Bloembergen GV. Close geographic association of human neehrlichiosis and tick populations carrying "*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*" in eastern Switzerland. *J Clin Microbiol.* 2013;51:169–76.
- Márton M, Markolt F, Szabó L, Kozák L, Lanszki J, Patkó L, Heltai M. Den site selection of the European badger, *Meles meles* and the red fox, *Vulpes vulpes* in Hungary. *Fol Zool.* 2016;65:72–9.
- Máthé Á, Vörös K, Németh T, Biksi I, Heteyey C, Manczur F, Tekes L. Clinicopathological changes and effect of imidocarb therapy in dogs experimentally infected with *Babesia canis*. *Acta Vet Hung.* 2006;54:19-33.
- McCoy KD, Chapuis E, Tirard C, Boulinier T, Michalakakis Y, Bohec CL, Maho YL, Gauthier-Clerc M. Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. *Proc Biol Sci.* 2005;272:2389–95.
- Meng H, Xu S, Yu Z, Liu Z, Liu J, Yang X, Liu J. The life cycle and occurrence of *Haemaphysalis concinna* (Acari: Ixodidae) under field conditions. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:887–91.
- Meyer-König A, Zahler M, Gothe R. Studies on the critical water mass and the rehydration potential of unfed adult *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 2001;25:505–16.
- Mihalca AD, Dumitrache MO, Magdaş C, Gherman CM, Domşa C, Mircean V, Ghira IV, Pocora V, Ionescu DT, Sikó Barabási S, Cozma V, Sándor AD. Synopsis of the hard ticks (Acari: Ixodidae) of Romania with update on host associations and geographical distribution. *Exp Appl Acarol.* 2012;58:183–206.
- Mihalca AD, Dumitrache MO, Sándor AD, Magdaş C, Oltean M, Györke A, Matei IA, Ionică A, D'Amico G, Cozma V, Gherman CM. Tick parasites of rodents in Romania: host preferences, community structure and geographical distribution. *Parasit Vectors.* 2012;5:266.
- Mihalca AD, Kalmár Z, Dumitrache MO. *Rhipicephalus rossicus*, a neglected tick at the margin of Europe: a review of its distribution, ecology and medical importance. *Med Vet Entomol.* 2015;29:215–24.
- Milutinovic M, Aleksic N, Bobic B, Miscevic Z. A study of the sex ratio of the ticks (Acarina, Ixodidae) of Serbia. *Acta Vet Beograd.* 1996;46:147–54.
- Minar J. [Relation of foci of tick-borne encephalitis to original plant associations in the Czech Republic.] *Ceska Epidem Mikrobiol Imunol.* 1992;41:307–13. [In Czech]
- Mitani H, Takahashi M, Masuyama M, Fukunaga M. *Ixodes philipi* (Acari: Ixodidae): phylogenetic status inferred from mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene sequence comparison. *J Parasitol.* 2007;93:719–22.
- Moskvitina SN, Korobitsyn GI, Tyutenkov OY, Gashkov IS, Kononova VY, Moskvitin SS, Romanenko NV, Mikryukova PT, Protopopova VE, Kartashov YM, Chausov VE, Konovalova NS, Tupota LN, Sementsova OA, Ternovoy AV, Loktev BV. The potential role of migratory birds in the spread of Tick-borne infections in Siberia and the Russian Far East. *Achiev Life Sci.* 2014;8:118–20.
- Mysterud A, Easterday WR, Qviller L, Viljugrein H, Ytrehus B. Spatial and seasonal variation in the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in questing *Ixodes ricinus* ticks in Norway. *Parasit Vectors.* 2013;6:187.
- Newton I. *The Migration Ecology of Birds.* First edition. Academic Press, London, 2008.

- Netusil J, Zákovská A, Horváth R, Dendis M, Janouskovicová E. Presence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in mites parasitizing small rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2005;5:227–232.
- Neumann LG. Ixodidae: *Dermacentor reticulatus*. *Das Tierreich.* 1911;26:98–100.
- Nishihara H, Hasegawa M, Okada N. Pegasoferae, an unexpected mammalian clade revealed by tracking ancient retroposon insertions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:9929–34.
- Norte AC, da Silva LP, Tenreiro PJ, Felgueiras MS, Araújo PM, Lopes PB, Matos C, Rosa A, Ferreira PJ, Encarnação P, Rocha A, Escudero R, Anda P, Núncio MS, Lopes de Carvalho I. Patterns of tick infestation and their *Borrelia burgdorferi* s.l. infection in wild birds in Portugal. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6:743–50.
- Nosek J. The ecology, bionomics and behaviour of *Haemaphysalis (Haemaphysalis) concinna* tick. *Zentralbl Parasitenkd.* 1971a;36:233–41.
- Nosek J. The ecology, bionomics and behaviour of *Haemaphysalis (Aboimimalis) punctata* tick in Central Europe. *Zentralbl Parasitenkd.* 1971b;37:198–210.
- Nosek J. The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in Central Europe. *Fol Parasitol.* 1972;19:93–102.
- Nosek J, Sixl W. Central-European Ticks (Ixodoidea). Key for determination. – *Jahrbuch der naturwissenschaftlichen Abteilung Joanneum* 1972;1/2:61–92.
- Nosek J. Overwintering cycles in *Dermacentor* ticks. *Angew Parasitol.* 1979;20:34–7.
- Noureddine R, Chauvin A, Plantard O. Lack of genetic structure among Eurasian populations of the tick *Ixodes ricinus* contrasts with marked divergence from north-African populations. *Int J Parasitol.* 2011;41:183–92.
- Novacco M, Meli ML, Gentilini F, Marsilio F, Ceci C, Pennisi MG, Lombardo G, Lloret A, Santos L, Carrapico T, Willi B, Wolf G, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Vet Microbiol.* 2010;142:276–84.
- Novakova M, Bulkova A, Costa FB, Kristin A, Krist M, Krause F, Liznarova E, Labruna MB, Literak I. Molecular characterization of 'Candidatus Rickettsia vini' in *Ixodes arboricola* from the Czech Republic and Slovakia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6:330–3.
- Ogden NH, Bown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennett M. Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol.* 1998;12:423–9.
- Oliver JH. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Ann Rev Ecol Syst.* 1989;20:397–430.
- Olsén B, Jaenson TG, Bergström S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:3082–7.
- Orlova M. Invasion of specific ectoparasites of Siberian–Far Eastern bat species to the Urals. *Russian J Biol Invas.* 2014;5:29–31.
- Overzier E, Pfister K, Thiel C, Herb I, Mahling M, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks: comparison of prevalences and partial 16S rRNA gene variants in urban, pasture, and natural habitats. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:1730–4.
- Pavlović I, Milutinović M, Petković D, Terzin D, Terzin V. Epizootiological research of canine babesiosis in the Belgrade district. *J Protozool Res.* 2002;12:10–15.
- Pereira MJR, Rebelo H, Rainho A, Palmeirim JM. Prey selection by *Myotis myotis* (Vespertilionidae) in a Mediterranean region. *Acta Chiropterol.* 2002;4:183–193.
- Perkins SE, Cattadori IM, Tagliapietra V, Rizzoli AP, Hudson PJ. Localized deer absence leads to tick amplification. *Ecology* 2006;87:1981–6.
- Petney TN, Keirans JE. Ticks of the genus *Ixodes* in South-east Asia. *Trop Biomed.* 1994;11: 123–34.
- Pérez-Eid C, Macaigne F, Gilot B. Ecological approach to biotopes of *Haemaphysalis (Alloceraea) inermis* Birula, 1895, in France. *Acarologia* 1993;34:205–9. [franciául]
- Piksa K, Nowak-Chmura M, Siuda K. First case of human infestation by the tick *Ixodes vespertilionis* (Acari: Ixodidae). *Int J Acarol.* 2013;38:1–2.
- Piksa K, Górz A, Nowak-Chmura M, Siuda K. The patterns of seasonal activity of *Ixodes vespertilionis* (Acari: Ixodidae) on *Rhinolophus hipposideros* in nursery colonies. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:69–74.
- Plantard O, Bouju-Albert A, Malard M-A, Hermouet A, Capron G, Verheyden H. Detection of *Wolbachia* in the tick *Ixodes ricinus* is due to the presence of the Hymenoptera endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. *PLoS ONE* 2012;7:e30692.
- Polin H, Hufnagl P, Haunschmid R, Gruber F, Ladurner G. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2285–6.

- Pomykal J. A case of infestation of humans with fleas *Archaeopsylla erinacei* (Siphonaptera, Pulicidae). *Folia Parasitol.* 1985;32:348.
- Ponomareva PE, Mikryukova PT, Gori VA, Kartashov YM, Protopopova VE, Chausov VE, Konovalova NS, Tupota LN, Gheorghita DS, Burlacu IV, Ternovoi AV, Loctev BV. Detection of Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis viral RNA in ticks collected in Republic of Moldova. *J Vector Borne Dis* 2015;52:334–6.
- Presetnik P, Aulagnier S. Diet of *Miniopterus schreibersii* in northeastern Slovenia (Central Europe). *Mammalia* 2013;77:297–305.
- Proboste T, Kalema-Zikusoka G, Altet L, Solano-Gallego L, Fernández de Mera IG, Chirife AD, Muro J, Bach E, Piazza A, Cevidanes A, Blanda V, Mugisha L, de la Fuente J, Caracappa S, Millán J. Infection and exposure to vector-borne pathogens in rural dogs and their ticks, Uganda. *Parasit Vectors.* 2015;8:306.
- Purnell RE: Bovine babesiosis in the European community. *Vet Sci Commun.* 1978;1:289–96.
- Rachinsky A, Guerrero FD, Scoles GA. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Vet Parasitol.* 2008;152:294–313.
- Randolph SE. The effect of *Babesia microti* on feeding and survival in its tick vector, *Ixodes trianguliceps*. *Parasitology* 1991;102(Pt 1):9–16.
- Randolph SE. Mighty theories from little acorns grow: is Lyme disease risk predictable from mast-seeding by oak trees? *Trends Ecol Evol.* 1998;13:301–3.
- Randolph SE, Gern L, Nuttall PA. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today.* 1996;12:472–9.
- Randolph SE, Green R, Peacey MF, Rogers DJ. Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology* 2000;121:15–23.
- Randolph SE, Green RM, Hoodles AN, Peacey MF. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 2002;32:979–89.
- Randolph SE. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology*, 2004;29(Suppl.):37–65.
- Randolph SE. The impact of tick ecology on pathogen transmission dynamics. In: Bowman AS, Nuttall PA (Eds.), *Ticks: biology, disease and control.* Cambridge University Press, 2008, p. 47.
- Rar V, Golovljova I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus* Neoehrlichia” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect Genet Evol.* 2011;11:1842–61.
- Rar VA, Epikhina TI, Suntsova OV, Kozlova IV, Lisak OV, Pukhovskaya NM, Vysochina NP, Ivanov LI, Tikunova NV. Genetic variability of *Babesia* parasites in *Haemaphysalis* spp. and *Ixodes persulcatus* ticks in the Baikal region and Far East of Russia. *Infect Genet Evol.* 2014;28:270–5.
- Rees DJ, Dioli M, Kirkendall LR. Molecules and morphology: evidence for cryptic hybridization in African *Hyalomma* (Acari: Ixodidae). *Mol Phylogenet Evol.* 2003;27:131–42.
- Reeves WK, Dowling AP, Dasch GA. Rickettsial agents from parasitic Dermanysoidea (Acari: Mesostigmata). *Exp Appl Acarol.* 2006;38:181–8.
- Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol.* 1991;173:1576–89.
- Reháček J, Urvölgvi J, Kocianová E, Sekeyová Z, Vavreková M, Kováčová E. Extensive examination of different tick species for infestation with *Coxiella burnetii* in Slovakia. *Eur J Epidemiol.* 1991;7:299–303.
- Rigó K, Gyuranecz M, Tóth AG, Földvári G. Detection of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and *Anaplasma phagocytophilum* in small mammals and ectoparasites in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11:1499–501.
- Richter D, Schlee DB, Matuschka FR. Reservoir competence of various rodents for the lyme disease spirochete *Borrelia spielmanii*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:3565–70.
- Rivers NM, Butlin RK, Altringham JD. Autumn swarming behaviour of Natterer’s bats in the UK: population size, catchment area and dispersal. *Biologic Conserv.* 2006;127:215–26.
- Robbins RG, Bangs MJ. First report of *Ixodes kopsteini* Oudemans (Acari: Ixodida: Ixodidae) from the Kingdom of Cambodia, with a summary of known hosts of this tick in continental southeastern Asia. *Proc Entomol Soc Wash.* 2004;106:472–4.
- Robinson WH. *Urban insects and Arachnids.* Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2005, p. 397.
- Rossi MID, Aguiar-Alves F, Santos S, Paiva J, Bendas A, Fernandes O, Labarthe N. Detection of *Wolbachia* DNA in blood from dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *Exp Parasitol.* 2010;126:270–2.
- Rubel F, Brugger K, Walter M, Vogelgesang JR, Didyk YM, Fu S, Kahl O. Geographical distribution, climate adaptation and vector competence of the Eurasian hard tick *Haemaphysalis concinna*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018;9:1080-9.

- Ruedi M, Stadelmann B, Gager Y, Douzery EJ, Francis CM, Lin LK, Guillén-Servent A, Cibois A. Molecular phylogenetic reconstructions identify East Asia as the cradle for the evolution of the cosmopolitan genus *Myotis* (Mammalia, Chiroptera). *Mol Phylogenet Evol.* 2013;69:437–49.
- Rupp D, Zahn A, Ludwig P. Actual records of bat ectoparasites in Bavaria (Germany). *Spixiana* 2004;27:185–90.
- Sakamoto L, Ichikawa Y, Sakata Y, Matsumoto K, Inokuma H. Detection of *Anaplasma bovis* DNA in the peripheral blood of domestic dogs in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2010;63:349–52.
- Santos H, Rousselet J, Magnoux E, Paiva MR, Branco M, Kerdelhué C. Genetic isolation through time: allochronic differentiation of a phenologically atypical population of the pine processionary moth. *Proc Biol Sci.* 2007;274:935–41.
- Sándor AD, Kontschán J, Plantard O, Péter Á, Hornok S. Illustrated redescription of the male of *Ixodes simplex* Neumann, 1906. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018;9:1328–30.
- Schnittger L, Yin H, Gubbels MJ, Beyer D, Niemann S, Jongejan F, Ahmed JS. Phylogeny of sheep and goat *Theileria* and *Babesia* parasites. *Parasitol Res.* 2003;91:398–406.
- Schreeg ME, Marr HS, Tarigo JL, Cohn LA, Bird DM, Scholl EH, Levy MG, Wiegmann BM, Birkenheuer AJ. Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of Piroplasmida phylogeny. *PLoS One.* 2016;11:e0165702.
- Schulze P. Die morphologische Bedeutung des Afters und seiner Umgebung bei den Zecken. *Zschr Morphol Ökol Tiere.* 1942;38:630–58.
- Sebek Z, Sixl W, Rosicky B. Ein Beitrag zur Charakteristik der Naturherde der Piroplasmose und zur Kenntnis der Wirtstiere mit Daten zur Rinderplasmosis in der Steiermark und von Kleinsäugeruntersuchungen in der CSSR (Sporozoa, Haemosporina). *Mitteilungen der Abteilung für Zoologie am Landesmuseum Joanneum Graz* 1975;4:67–80.
- Ševčík M, Krištofík J, Uhrin M, Benda P. New records of ticks (Acari: Ixodidae) parasitising on bats in Slovakia. *Vespertilio* 2010;13-14:139–47.
- Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Fingerle V, Just FT, Pfister K. *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:972–4.
- Siuda K, Stanko M, Piksa K, Gorz A. Ticks (Acari: Ixodida) parasitizing bats in Poland and Slovakia. *Wiad Parazytol.* 2009;55:39–45.
- Spellerberg IF. Ecological Effects of Roads and Traffic: A Literature Review. *Global Ecol Biogeogr.* 1998;7:317–33.
- Spisák S, Solymosi N, Ittész P, Bodor A, Kondor D, Vattay G, Barták BK, Sipos F, Galamb O, Tulassay Z, Szállási Z, Rasmussen S, Sicheritz-Ponten T, Brunak S, Molnár B, Csabai I. Complete Genes May Pass from Food to Human Blood. *PLoS ONE* 2013;8(7):e69805.
- Špitalská E, Literák I, Kocianová E, Taragelová V. The Importance of *Ixodes arboricola* in transmission of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the Czech Republic, Central Europe. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2011;11:1235–41.
- Špitalská E, Sparagano O, Stanko M, Schwarzová K, Špitalský Z, Škultéty L, Havlíková SF. Diversity of *Coxiella*-like and *Francisella*-like endosymbionts, and *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* as pathogens in the tick populations of Slovakia, Central Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018;9:1207-11.
- Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, Gaasenbeek C, van der Giessen JW. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasit Vectors.* 2009;2:41.
- Stańczak J, Racewicz M, Michalik J, Cieniuch S, Sikora B, Skoracki M. Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in feeding ticks and their hosts in western Poland. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(Suppl 2):328–9.
- Stanek G, Burger I, Hirschel A, Wewalka G, Radda A. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. *Zentralbl. Bakteriol Hyg.* 1986;A 263:29–33.
- Stuen S, Pettersen KS, Granquist EG, Bergström K, Bown KJ, Birtles RJ. *Anaplasma phagocytophilum* variants in sympatric red deer (*Cervus elaphus*) and sheep in southern Norway. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013;4:197–201.
- Szabó MP, Mangold AJ, João CF, Bechara GH, Guglielmone AA. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Vet Parasitol.* 2005;130:131–40.
- Szemethy L, Ritter D, Heltai M, Pető Z. The effects of human disturbances on the movements of red deer. In: *Proceedings of the XXII. Congress of International Union of Game Biologists (Sofia, Bulgaria), 1995*, pp. 174–7.

- Széll Z, Sréter-Lancz Z, Márialigeti K, Sréter T. Temporal distribution of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* in Hungary. *Vet Parasitol.* 2006;141: 377–9.
- Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi M, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tunoda T, Turumi M, Ando S, Andoh M, Sato K, Kawabata H. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification based on the mitochondrial 16S rDNA gene. *Eisei Dobutsu.* 2014;65:13–21.
- Taragelová V, Koci J, Hanincová K, Kurtenbach K, Derdákóvá M, Ogden NH, Literák I, Kocianová E, Labuda M. Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in Central Europe. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:1289–93.
- Teacher AG, Thomas JA, Barnes I. Modern and ancient red fox (*Vulpes vulpes*) in Europe show an unusual lack of geographical and temporal structuring, and differing responses within the carnivores to historical climatic change. *BMC Evol Biol.* 2011;11:214.
- Telfer S, Clough HE, Birtles LR, Bennett M, Carslake D, Helyar S, Begon M. Ecological differences and coexistence in a guild of microparasites: Bartonella in wild rodents. *Ecology* 2007;88:1841–9.
- Telford SR 3rd, Mather TN, Moore SI, Wilson ML, Spielman A. Incompetence of deer as reservoirs of the Lyme disease spirochete. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;39:105–9.
- Tovornik D, Cerný V. Finding of *Haemaphysalis erinacei erinacei* Pavesi, 1884 on birds in Yugoslavia. *Fol Parasitol.* 1974;21:282.
- Trout Fryxell RT, Moore JE, Collins MD, Kwon Y, Jean-Philippe SR, Schaeffer SM, Odoi A, Kennedy M, Houston AE. Habitat and Vegetation Variables Are Not Enough When Predicting Tick Populations in the Southeastern United States. *PLoS One* 2015;10:e0144092.
- Tsunoda T, Tatsuzawa S. Questing height of nymphs of the bush tick, *Haemaphysalis longicornis*, and its closely related species, *H. mageshimaensis*: correlation with body size of the host. *Parasitology* 2004;128(Pt 5):503–9.
- Uilenberg G, Rombach MC, Perié NM, Zwart D. Blood parasites of sheep in the Netherlands. II. *Babesia motasi* (Sporozoa, Babesiidae). *Vet Q.* 1980;2:3–14.
- Uspensky I. Preliminary observations on specific adaptations of exophilic ixodid ticks to forests or open country habitats. *Exp Appl Acarol.* 2002;28:147–54.
- Uspensky I. Tick pests and vectors (Acari: Ixodoidea) in European towns: Introduction, persistence and management. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:41–7.
- van Oldenborgh GJ. The mild winter of 2007 – What were the causes? http://www.knmi.nl/kenniscentrum/zachte_winter_2007/index_en.html. [hozzáférés: június 23, 2007]
- Vanderhoof-Forschner K. Everything you need to know about Lyme disease and other tick-borne disorders. John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2003, USA, 270 pp .
- Venzal JM, Nava S, Terassini FA, Orgrsewalska M, Camargo LMA, Labruna MB. *Ornithodoros peropteryx* (Acari: Argasidae) in Bolivia: an argasid tick with a single nymphal stage. *Exp Appl Acarol.* 2013;61:231–41.
- Verginelli F, Capelli C, Coia V, Musiani M, Falchetti M, Ottini L, Palmirotta R, Tagliacozzo A, De Grossi Mazzorin I, Mariani-Costantini R. Mitochondrial DNA from prehistoric canids highlights relationships between dogs and South-East European wolves. *Mol Biol Evol.* 2005;22:2541–51.
- Vincent S, Nemoz M, Aulagnier S. Activity and foraging habitats of *Miniopterus schreibersii* (Chiroptera, Miniopteridae) in southern France: implications for its conservation. *Hystrix It J Mammal.* 2011;22:57–72.
- Vojta L, Mrljak V, Curković S, Zivcncjak T, Marinculić A, Beck R. Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia. *Int J Parasitol.* 2009;39:1129–36.
- Walker AR. Age structure of a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in relation to its seasonal questing. *Bull Entomol Res.* 2001;91:69–78.
- Walker JB, Keirans JE, Horak IG. The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae). A Guide to the Brown Ticks of the World. Cambridge Univ. Press 2000, Cambridge, UK.
- Wengi N, Willi B, Boretti FS, Cattori V, Riond B, Meli ML, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Vet Microbiol.* 2008;126:132–41.
- Wickham C, Rohde R, Muller RA, Wurtele J, Curry J, Groom D, Jacobsen R, Perlmutter S, Rosenfeld A, Mosher S. Influence of Urban Heating on the Global Temperature Land Average using Rural Sites Identified from MODIS Classifications. *Geoinfor Geostat: An Overview* 2013;1:2.

- Williams B, Berentsen A, Shock B, Teixeira M, Dunbar M, Becker M, Yabsley M. Prevalence and diversity of *Babesia*, *Hepatozoon*, *Ehrlichia* and *Bartonella* in wild and domestic carnivores from Zambia, Africa. *Parasitol Res.* 2014;113:911–8.
- Wilson N. New distributional records of ticks from Southeast Asia and the Pacific (Metastigmata: Argasidae, Ixodidae). *Oriental Insects* 1970;4:37–46.
- Witsenburg F, Schneider F, Christe P. Epidemiological traits of the malaria-like parasite *Polychromophilus murinus* in the Daubenton's bat *Myotis daubentonii*. *Parasit Vectors.* 2014;7:566.
- Wodecka B, Michalik J, Lane RS, Nowak-Chmura M, Wierzbicka A. Differential associations of *Borrelia* species with European badgers (*Meles meles*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in western Poland. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:1010–6.
- Woodruff DS. Biogeography and conservation in Southeast Asia: How 2.7 million years of repeated environmental fluctuations affect today's patterns and the future of the remaining refugial-phase biodiversity. *Biodivers Conserv.* 2010;19:919–41.
- Yabsley MJ, Murphy SM, Luttrell MP, Wilcox BR, Howerth EW, Munderloh UG. Characterization of 'Candidatus Neoehrlichia lotoris' (family Anaplasmataceae) from raccoons (*Procyon lotor*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008a;58:2794–8.
- Yabsley MJ, Murphy SM, Luttrell MP, Wilcox BR, Ruckdeschel C. Raccoons (*Procyon lotor*), but not rodents, are natural and experimental hosts for an ehrlichial organism related to "Candidatus Neoehrlichia mikurensis". *Vet Microbiol.* 2008b;131:301–8.
- Yamaguti N, Tipton VJ, Keegan HL, Toshioka S: Ticks in Japan, Korea and Ryukyu islands. *Brigham Young Univ Sci Bull Biol Ser.* 1971;15:1–226.
- Yamauchi T, Funakoshi K. Ticks (Acari: Ixodoidea) from Chiroptera (Mammalia) of the Kyushu mainland, Japan. *J Acarol Soc Japan.* 2000;9:51–4.
- Zahler M, Gothe R. Evidence for the reproductive isolation of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) ticks based on cross-breeding, morphology and molecular studies. *Exp. Appl. Acarol.* 1997;21:685–96.
- Zajac Z, Katarzyna B, Buczek A. Factors influencing the distribution and activity of *Dermacentor reticulatus* (F.) ticks in an anthropopressure-unaaffected area in central-eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2016;23:270–5.
- Zemtsova GE, Apanaskevich DA, Reeves WK, Hahn M, Snellgrove A, Levin ML. Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and its relationships with climatic factors. *Exp Appl Acarol.* 2016;69:191–203.
- Zivkovic Z, Nijhof AM, de la Fuente J, Kocan KM, Jongejan F. Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. *BMC Vet Res.* 2007;3:32.

8. Köszönetnyilvánítás

Időrendi sorrendben, hálás vagyok Prof. Kassai Tibornak, akihez – csaknem 30 éve – még egyetemi hallgatóként fordultam, és aki örömmel fogadta érdeklődésemet a parazitológia iránt, "felfedezve" engem e tudományterület számára. Ugyancsak köszönettel tartozom Prof. Varga Istvánnak, aki PhD témavezetőként támogatta kutatói-oktatói pályakezdésemet. Köszönöm továbbá Prof. Farkas Róbertnek, hogy PhD tanulmányaim után segített megvalósítani a kezdetektől dédelgetett szakmai terveimet, hogy vérszívó ízeltlábúak által közvetített (nemcsak egysejtű) kórokozókkal foglalkozhassak. Külföldi partnereim közül e tekintetben kiemelkedik Prof. Regina Hofmann-Lehmann (Zürichi Egyetem, Állatorvosi Kar, Klinikai Laboratórium vezető), aki több, mint tíz éve lehetővé tette svájci tanulmányútjaimat, és – lelkesedésemet, munkakedvemet látva – módszertani, anyagi és erkölcsi támogatását azóta is folyamatosan biztosította.

Újabb keletű, eredményességükben szintén kimagasló szakmai együttműködések köszönhetek kutató barátaimnak, Kontschán Jenőnek (Növényvédelmi Intézet), Kováts Dávidnak (Magyar Biodiverzitás-kutató Társaság) és Sándor Attilának (Kolozsvári Agrártudományi és Állatorvosi Egyetem). A madaras illetve denevéres vizsgálatok nem valósulhattak volna meg e szakterületek hazai és nemzetközi hírű művelői (társszerzőim) nélkül, akik közül kiemelkedik Csörgő Tibor (Ócsai Madárvárta) illetve Görföl Tamás (Magyar Természettudományi Múzeum), Estók Péter (Eszterházy Károly Egyetem) és Boldogh Sándor (Aggteleki Nemzeti Park). Magas színvonalú módszertani segítséget kaptam még munkatársamtól, Takács Nórától is, akinek hálás vagyok precizitásáért és segítőkészségéért. Ugyancsak nélkülözhetetlen és rendszeres szakmai kapcsolatot jelentett számomra Gyuranecz Miklós és kutatócsoportjának tagjai, akik a bakteriológia általam nem művelt területein működtek közre kutatásaimban.

További külföldi partnereim, akik ismételt támogatást nyújtottak munkáimhoz – a teljesség igénye nélkül –, Prof. José de la Fuente (IREC, Spanyolország), Olivier Plantard (Oniris, Állatorvosi Kar, Franciaország), Prof. Agustín Estrada-Peña (Zaragozai Egyetem, Spanyolország), Prof. Yuanzhi Wang (Shihezi Egyetem, Kína), Vuong Tan Tu (Ökológia és Biológiai Erőforrások Intézete, Vietnám), valamint Marina Meli és Enikő Gönczi (Zürichi Egyetem, Svájc). Köszönöm Horváth Gábor (hatósági állatorvos, Csurgó) és munkatársam, Földvári Gábor, valamint két PhD hallgatóm, Flaisz Barbara és Szőke Krisztina közreműködését, és rajtuk kívül is mindenkinek, aki társszerzőm volt vagy a cikkek köszönetnyilvánításaiban szerepel, továbbá az ÁTE Parazitológiai és Állattani Tanszéke minden egykori és jelenlegi munkatársának, akikkel együtt dolgoztam illetve dolgozom oktatási és kutatási feladataim megvalósításában.

Kutatásaim anyagi feltételét OTKA pályázatomban (115854), az EDENext project és az ÁTE Kutatókari (Kiválósági) forrásai nyújtották.

Végül, de első sorban köszönöm (a szabadidőmet sem kímélő) kutatásaimhoz nyújtott állandó családi háttérrel és türelmet feleségemnek, Kovalcsik Mariannak és kislányomnak, Viviennek, akit "szakmai ártalomként" sikerült megfertőznöm – paraziták helyett – az állatok szeretetével.

Mivel abban a megtiszteltetésben volt részem, hogy szakfordítóként és zarándokként tibeti buddhizmussal is foglalkozhattam, nem feledem: kutatásaimért a legnagyobb áldozatot maguk a paraziták hozták, mivel az eredményekért életüket adták.

འཇིགས་ཀྱི་ལྷོ་ལྷོ་